

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA**

**Determinación de anticuerpos contra Neospora  
caninum en búfalos de agua (Bubalus bubalis) en el  
distrito de Jenaro Herrera, Loreto**

**TESIS**

**para optar el título de Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Javier Alfonso Jara Vila**

**Lima – Perú**

**2009**

Agradezco a Dios por brindarme una familia ejemplar que me ayudó mucho para culminar mis estudios, a pesar de los obstáculos en mi vida universitaria.

Agradezco a mis padres y mi abuelita Julia por todo el cariño y apoyo que me brindan diariamente, encaminándome para lograr mis metas.

Agradezco a mis hermanos Julio, José, Jorge y Jesús, además de Mónica y Norma, por estar siempre ahí cuando más los necesito.

Agradezco el apoyo incondicional de las doctoras Amanda Chávez y Eva Casas al darme la oportunidad de realizar la tesis en el laboratorio de parasitología.

A mis amigos que estuvieron a mi lado en la etapa universitaria, y que me acompañan en todo momento: Angélica, Dianita, Jimmy, Sandra, Samy, Hernán, Bruno, William, Max, Gina, Ángel, Meche, Socrates, Charlene, Vanessa, Omar, Elvira, Eloy, Jonathan, Jennifer, Jeannie, Lilian, Stephanie, y a todos aquellos que no los menciono pero los tengo presentes.

Un agradecimiento especial a Rosita y Mercy que me apoyaron mucho en el desarrollo de la tesis.

A la doctora. Nofre Sánchez, al doctor Francisco Suárez y al ingeniero Rafael Chávez por todo su apoyo incondicional.

A mis mascotas que siempre me acompañan, y en especial a Kanito.

## CONTENIDO

	Pág.
CONTENIDO.....	iii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Etiología.....	3
2.2. Taxonomía.....	3
2.3. Características morfológicas y antigénicas.....	4
2.4. Ciclo Biológico.....	5
2.5. Epidemiología.....	7
2.5.1. Prevalencia.....	7
2.5.2. Factores de Riesgo.....	11
2.5.2.1. Hospederos.....	11
a. Hospedero definitivo.....	11
b. Hospedero intermediario.....	11
2.5.2.2. Transmisión.....	12
a. Transmisión vertical.....	12
b. Transmisión horizontal.....	12
2.5.2.3. Parásito.....	13
2.5.2.4. Edad.....	13
2.5.2.5. Sexo.....	14
2.5.2.6. Medio ambiente.....	14
2.5.3. Importancia de la Neosporosis.....	14
2.5.3.1. Importancia económica.....	14
2.5.3.2. Importancia en Salud Pública.....	14

2.6. Patogenia.....	15
2.6.1. Patogenia del aborto.....	15
2.7. Inmunidad.....	16
2.7.1. Aspectos inmunes durante la gestación.....	17
2.7.2. Aspectos inmunes en infecciones por <i>N. caninum</i> .....	17
2.7.2.1. Inmunidad humoral.....	17
2.7.2.2. Inmunidad mediada por células.....	18
2.7.3. Inmunidad, gestación e infección por <i>N. caninum</i> .....	19
2.8. Signos clínicos.....	20
2.9. Lesiones.....	21
2.9.1. Lesiones histopatológicas.....	22
2.10. Diagnóstico.....	22
2.10.1. Diagnóstico serológico.....	23
2.10.1.1. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).....	23
2.10.1.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	24
2.10.1.3. Aglutinación Directa (DAT).....	24
2.10.1.4. Inmunoblot (IB).....	25
2.10.1.5 Prueba Rápida Inmunocromatográfica (ICT).....	25
2.10.2. Diagnóstico no Serológico.....	25
2.10.2.1. Aislamiento del parásito.....	25
2.10.2.2. Examen Histopatológico.....	26
2.10.2.3. Inmunohistoquímica (IHQ).....	26
2.10.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
2.11. Tratamiento.....	27
2.12. Control y Prevención.....	27
2.12.1. Medidas de Control.....	27
2.12.2. Prevención: perspectivas para la vacunación.....	28
2.13. Crianza de Ganado Bubalino en Jenaro Herrera.....	29
2.14. Características productivas y reproductivas de los búfalos de agua.....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. Lugar de estudio y Ubicación Geográfica.....	32
3.2. Animales.....	32
3.3. Materiales.....	33

3.4. Tamaño Muestral.....	33
3.5. Recolección de muestras.....	34
3.6. Procesamiento de las muestras.....	34
3.7. Desarrollo de las técnicas.....	34
3.7.1. Comprobación del conjugado anti IgG bovino.....	35
3.7.2. Técnica de ELISA indirecto.....	35
3.7.3. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
V. CONCLUSIONES.....	42
VI. RECOMENDACIONES.....	43
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	44
VIII. ANEXOS.....	58

### **LISTA DE CUADROS**

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en bovinos a nivel mundial.	8
<b>Cuadro 2.</b> Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en caninos a nivel mundial.	9
<b>Cuadro 3.</b> Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en búfalos de agua a nivel mundial.	10
<b>Cuadro 4.</b> Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en otras especies a nivel mundial.	10
<b>Cuadro 5.</b> Distribución de búfalos hembras muestreados en los Centros de Crianza de Búfalos del Distrito Jenaro Herrera, Departamento de Loreto – Perú. 2008.	33
<b>Cuadro 6.</b> Determinación de anticuerpos contra <i>Neospora caninum</i> en búfalos de agua del distrito Jenaro Herrera – Loreto mediante la prueba de ELISA. Perú. 2008.	39

## **LISTA DE FIGURAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema del ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	6

## ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad
- **DAT:** Aglutinación directa
- **ELISA:** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
- **H-E:** Hematoxilina-eosina
- **IB:** Immunoblot
- **ICT:** Prueba inmunocromatográfica
- **IFI:** Inmunofluorescencia indirecta
- **IFN:** Interferón gamma
- **Ig:** Inmunoglobulina
- **IHQ:** Inmunohistoquímica
- **IL:** Interleucinas
- **IMC:** Inmunidad mediada por células
- **IVITA:** Instituto veterinario de investigaciones tropicales y de altura
- **kDA:** Kilo daltons
- **NAT:** Test de aglutinación *Neospora*
- **OD:** Densidad Óptica
- **ON:** Óxido nítrico
- **PBS:** Solución salina tamponada con fosfato
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PP:** Valores porcentuales positivos
- **PV:** Peso vivo
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **Th:** Linfocitos T helper
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral



## RESUMEN

La neosporosis es una parasitosis de importancia en el sector ganadero al producir problemas reproductivos como causante de abortos y mortalidad neonatal. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos de agua procedentes de cinco centros de crianza ubicados en el distrito Jenaro Herrera, perteneciente al departamento de Loreto en el año 2008. Se evaluaron 83 muestras de suero, obtenidas de búfalos hembra en etapa productiva con propósito lechero, que fueron evaluadas utilizando dos pruebas diagnósticas: ELISA indirecto e Inmunofluorescencia indirecta (IFI). No se halló (0/83) evidencia de anticuerpos contra *N. caninum* a las diluciones 1:25 y 1:100 utilizando ELISA indirecto; así como a la dilución 1:100 con IFI. Estos resultados sugieren una baja o nula exposición de los búfalos de agua al parásito en la zona estudiada. El presente trabajo es el primer registro de evidencia serológica contra la infección de *Neospora caninum* en los búfalos de agua del Perú, siendo necesario realizar más estudios que confirmen estos hallazgos.

**Palabras claves:** *Neospora caninum*, búfalos de agua, anticuerpos, ELISA, IFI.

## ABSTRACT

The neosporosis is a parasitosis that has importance in the dairy cattle. The infection has been associated with reproductive problems as abortions and mortality neonatal. The aim of this study was determine the presence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes coming from five breeders located in Jenaro Herrera district, Loreto, 2008. 83 sera samples, obtained from female dairy buffaloes, were tested by using indirect ELISA and indirect fluorescent antibody test (IFAT). None of sera (0/83) presented antibodies against *N. caninum* to the dilution 1:25 and 1:100 using indirect ELISA; neither to the dilution 1:100 by IFAT. These results suggest a low exposition of water buffaloes to parasites in the studied area. The present work is the first to report serological evidence of *Neospora caninum* infection in peruvian water buffaloes, being necessary to carry out more studies that confirm these results.

**Keywords:** *Neospora caninum*, water buffaloes, antibodies, ELISA, IFI.

## I. INTRODUCCIÓN

La neosporosis es una enfermedad parasitaria emergente causada por un protozoo, *Neospora caninum*, el cual fue reportado inicialmente en 1984 en un perro con encefalitis congénita y pocos años después se demostró su participación como causa de aborto bovino (Bjerkas *et al.*, 1984, Dubey, 2003b). Diversos estudios determinaron que *Neospora caninum* afecta a una amplia gama de hospederos, entre los cuales se mencionan al perro y al coyote como los únicos hospederos definitivos definidos hasta el momento (McAllister *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 2004), y como hospederos intermediarios a los bovinos, búfalos de agua, equinos, caninos, ovinos, caprinos y muchos animales silvestres (Dubey y Lindsay, 1990, Dubey *et al.*, 1996; Gondim *et al.*, 2004).

La detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos ha sido reportado en diversos países a nivel mundial, mostrando seropositividad que varía desde 0 a 70.9%, encontrándose una mayor prevalencia en países de Sudamérica (Argentina y Brasil) en comparación con países europeos y asiáticos. En nuestro país se sabe que la Neosporosis bovina es altamente prevalente en las principales cuencas lecheras, observando una presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en el 57% de vacas en Arequipa (Andressen, 1999); 42.9% en Cajamarca (Cabrera *et al.*, 2000); 29.6% en el Valle de Lima (Silva *et al.*, 2002), y 1.5% en IVITA-Pucallpa (Rivera *et al.*, 2004).

La importancia económica en el sector ganadero, radica en las pérdidas productivas y reproductivas que se puedan producir, las cuales se encuentran relacionadas con el aborto, disminución del número de crías paridas, disminución en la producción láctea, además de los costos indirectos que incluyen el servicio profesional y el establecimiento del diagnóstico (Moore *et al.*, 2001). Por otro lado, la información acerca del impacto que puede tener la

neosporosis sobre el ganado bubalino en nuestro país es nula, a diferencia de otros países de Sudamérica, donde los búfalos de agua son importantes en la economía de estos países y otros a nivel mundial.

Sabiendo que el distrito de Jenaro Herrera, ubicado en la Región Loreto, depende económicamente de la producción lechera del ganado bubalino (García, 2006), el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos de agua del mencionado distrito, aportando información para futuros estudios epidemiológicos relacionados a este parásito en nuestro país.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Etiología

La neosporosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial causada por un protozoo denominado *Neospora caninum* que afecta a diferentes especies de animales; produciendo alteraciones neuromusculares en los perros, y abortos o mortalidad neonatal en los bovinos (Dubey, 2003b). La primera información data de 1984 cuando se identificó por primera vez la enfermedad en Noruega en una camada de perros con miositis y encefalomiелitis, encontrándose un parásito similar a *Toxoplasma gondii* en cerebro y músculo, sin embargo los animales afectados no presentaron anticuerpos contra este parásito (Bjerkas *et al.*, 1984; Rojas, 2004).

En 1988, en EEUU se aisló un parásito de características similares en muestras procedentes de 10 perros muertos con alteraciones neurológicas, demostrándose que se trataba de un parásito estructuralmente distinto al *Toxoplasma gondii*, el cual fue denominado *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988). En 1989, Thilsted y Dubey, asocian *Neospora* con un brote de abortos en vacunos de Nuevo México, y en 1993 se consiguió el primer aislamiento procedente de un feto bovino abortado (Conrad *et al.*, 1993). Desde entonces, *Neospora* ha sido descrito en vacunos de muchos países, e incluso en otras especies como ovejas, cabras, búfalos de agua, caballos, ciervos, camellos, coyotes, zorros (Rojas, 2004).

### 2.2 Taxonomía

*Neospora caninum*, actualmente está clasificado como (Dubey 1999, 2003a):

– Phylum : Apicomplexa

- Clase : Sporozoea
- Subclase : Coccidia
- Orden : Eucoccidia
- Suborden : Eimeriina
- Familia : Sarcocystidae
- Género : *Neospora*

Inicialmente se lo relacionó con *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* y *Hammondia heydorni*, y aunque el análisis de la secuencia de la subunidad menor del ARN ribosomal demostró un grado de homología entre *N. caninum* y *T. gondii* (Ellis *et al.*, 1994; Holmdahl *et al.*, 1994), otros autores mediante RAPD-PCR encontraron diferencias significativas entre el genoma de *Neospora*, *T. gondii* y *Sarcocystis* (Guo y Johnson, 1995), demostrando además diferencias biológicas, inmunológicas, morfológicas y moleculares entre *N. caninum* y *H. heydorni* (Dubey *et al.*, 2002).

### 2.3 Características morfológicas y antigénicas

Los únicos estadios parasitarios reconocidos en su ciclo biológico son: taquizoitos, quiste con bradizoitos y ooquiste. Los taquizoitos y los bradizoitos se encuentran en hospederos intermediarios, mientras que los ooquistes son eliminados en las heces por el hospedero definitivo, el canino (Dubey y Lindsay, 1996; McAllister *et al.*, 1998). Los taquizoitos son de morfología semilunar, globular u ovoide, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren, su tamaño varía entre 3-7µm de longitud y 1-5µm de ancho, y está compuesto por una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, un complejo apical formado por: 32 microtúbulos subpeliculares, dos anillos apicales, un conoide y un anillo polar; organelas secretoras compuestas por: hasta 150 micronemas, 8-18 roptrias y gránulos densos; mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, ribosomas, núcleo, nucleolo, y un poro posterior (Speer y Dubey, 1989; Lindsay *et al.*, 1999).

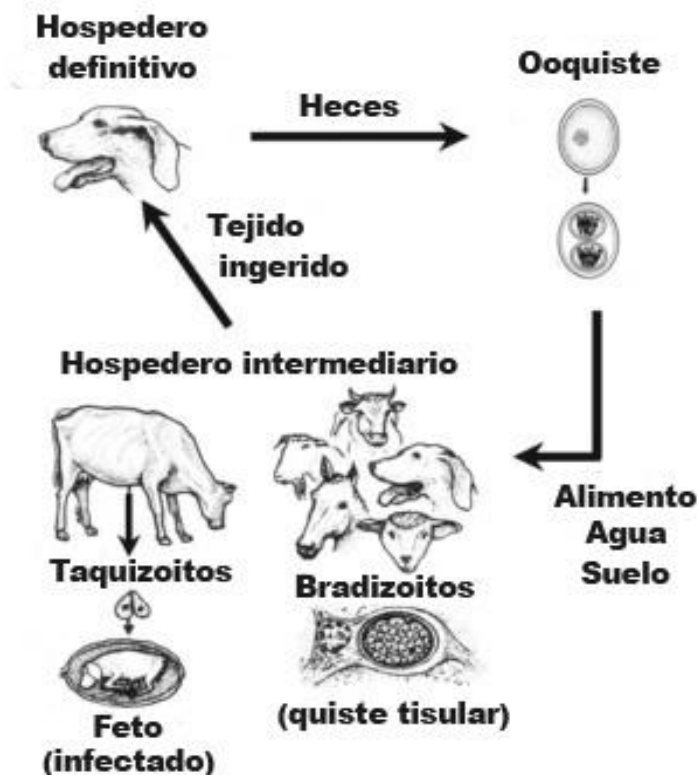
Los quistes tisulares, observados en tejido nervioso (cerebro, médula espinal y nervios periféricos), tejido muscular y retina de diversas especies con infecciones naturales y experimentales (Barr *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 2001), tienen forma redondeada u ovalada, midiendo hasta 107µm de longitud, cuya pared es lisa y gruesa a diferencia del *Toxoplasma gondii*, llegando a medir más de 4µm de grosor; en su interior se encuentran los bradizoitos que son delgados, miden 6-8 por 1-1.8µm y contienen las mismas organelas que los taquizoitos aunque en éstos el número de roptrias es menor (Dubey y Lindsay, 1996).

Los ooquistes de *N. caninum* son morfológicamente similares a los de *T. gondii* y *H. heydorni*; tienen forma esférica o subesférica, su tamaño es de 11.7µm de longitud y 11.3µm de ancho, con una pared lisa de 0.6-0.8µm de espesor y en su interior se aprecian dos esporoquistes (8.4 x 6.1µm) con cuatro esporozoitos (6.5 x 2.0µm) cada uno (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2002).

La identificación, localización y caracterización de moléculas de *N. caninum* involucradas en su interacción con los hospederos, son necesarias para descifrar su biología y desarrollar nuevos métodos para el inmunodiagnóstico. Actualmente se han descrito muchas proteínas mediante el uso de diferentes técnicas, localizando proteínas de 17-18 y 30-45kDa en la superficie del taquizoíto, entre las cuales tenemos el NcSAG1 que estaría involucrada en la adherencia pre-invasión (Björkman *et al.*, 1994; Hemphill *et al.*, 1999a), la proteína NcSRS2, que fue la primera proteína clonada de *N. caninum*, expresándose tanto en taquizoítos como bradizoítos siendo considerada como uno de los antígenos inmunodominantes (Hemphill *et al.*, 1996; Fuchs *et al.*, 1998). Además se han caracterizado tres proteínas de micronemas: NcMIC3, NcMIC2 y NcMIC1 de 38, 95 y 60kDa, respectivamente (Lovett *et al.*, 2000; Sonda *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2002); se identificó un grupo de proteínas localizadas en los gránulos densos, denominados GRA, que tienen por función establecer el adecuado funcionamiento de la vacuola parasitófora (Hemphill *et al.*, 1999a).

## **2.4 Ciclo Biológico**

En el ciclo biológico puede diferenciarse dos fases: una sexual (en cánidos) y otra asexual (rumiantes, cánidos, equinos), con formación de taquizoitos y quistes tisulares conteniendo bradizoitos (Dubey y Lindsay, 1996; McAllister *et al.*, 1998). Los hospederos definitivos adquieren la infección al ingerir tejidos de hospederos intermediarios conteniendo quistes (placenta, restos de fetos abortados y descargas uterinas) en cuyo interior se encuentran bradizoitos, los cuales se sugiere son los únicos que pueden inducir la excreción de ooquistes en los hospederos definitivos (Lindsay *et al.*, 2001; Dijkstra *et al.*, 2002). Una vez localizados en el sistema digestivo, la pared del quiste es degradada por los jugos gástricos liberando las formas parasitarias que inician los estados entero-epiteliales, donde ocurre la multiplicación sexual con la posterior formación de ooquistes (figura 1).



**Figura 1.** Esquema del ciclo biológico de *Neospora caninum* (Fuente: Dubey *et al.*, 2007)

El hospedero definitivo elimina al medio ambiente ooquistes sin esporular, que son excretados con las heces y en un lapso de 24 a 72 horas estos esporulan, conteniendo dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno, volviéndose así infectivos (Lindsay *et al.*, 2001). Es importante observar que poco se sabe actualmente con respecto a la frecuencia de eliminación de ooquistes, la supervivencia de estos en el medio ambiente y si los perros pueden eliminar ooquistes tras la ingestión de ooquistes esporulados (McAllister *et al.*, 1998).

Los ooquistes esporulados son ingeridos por los hospederos intermediarios, llegando al tracto gastrointestinal donde son liberados los esporozoitos, los cuales penetran en las células entéricas transformándose en taquizoitos (Gondim *et al.*, 2002). Estos, penetran las células por invasión activa en menos de cinco minutos (Hemphill *et al.*, 1996), localizándose en el citoplasma de macrófagos, neuronas, fibroblastos, hepatocitos, miocitos y células epiteliales de los túbulos renales, dentro de una vacuola parasitófora, donde como resultado de la endodigenia, se producen dos zoitos idénticos y de estos, otros dos, pudiendo albergar una célula hospedera más de 100 taquizoitos (Hemphill *et al.*, 1996; Gondim *et al.*, 2002), que tras la ruptura celular, salen al medio extracelular y en pocas horas inician los mecanismos de adhesión e invasión de nuevas células diana (Hemphill *et al.*, 1996). Se sabe que en la fase crónica los taquizoitos se diferencian en bradizoitos formando los quistes tisulares, que se



localizan principalmente en tejido nervioso y tejido muscular, sin embargo no se conocen los mecanismos implicados en la conversión de estos (Peters *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2006).

## **2.5 Epidemiología**

### **2.5.1 Prevalencia**

Los estudios de prevalencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* indican que la neosporosis presenta una amplia distribución mundial, encontrándose en Australia, Nueva Zelanda, Europa, China, Japón, África y América, siendo notificado en muchas especies animales como bovinos, ovinos, búfalos de agua, equinos, caninos, camélidos, entre otros (Dubey *et al.*, 2007).

Las prevalencias más estudiadas se dan en la especie bovina, encontrando anticuerpos en diferentes países utilizando principalmente dos métodos diagnósticos, ELISA e Inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando diferentes puntos de corte. En el Perú se registran valores de prevalencia que van desde 1.5% en Pucallpa (Rivera *et al.*, 2004) hasta 57% en Arequipa (Andressen, 1999), observando que existe mayor seropositividad en las principales cuencas lecheras del país (cuadro 1).

Por otro lado, se han reportado prevalencias en la especie canina que varían desde 0.5% hasta 94.5% en diferentes países. Así mismo se observó que utilizando tres métodos de diagnóstico: ELISA, IFI y Test de Aglutinación, en nuestro país la mayor prevalencia se encuentra en el departamento de Lima con un valor de 32.7% (Del Campo *et al.*, 2003) (cuadro 2).

En cuanto a datos reportados en búfalos de agua (cuadro 3), se halló 64% en Argentina (Campero *et al.*, 2007); 70.9% en el Norte de Brasil (Gennari *et al.*, 2005); 64% en el Sur este de Brasil (Fujii *et al.*, 2001); 35.9% en Estado de Bahía-Brasil (Gondim *et al.*, 2007), 34.6% en Italia (Guarino *et al.*, 2000). 14.6% en Estado Rio Grande del Sur-Brasil (Flôres *et al.*, 2006), 0 en China (Yu *et al.*, 2007); 50% en India (Meenakshi *et al.*, 2007), 37% en Irán (Haji *et al.*, 2007), 1.5% en Vietnam (Huong *et al.*, 1998).

Además, la neosporosis ha sido reportada en rumiantes menores, camélidos sudamericanos, cerdos, gatos, equinos, caninos silvestres (cuadro 4), y aunque estos reportes de prevalencia no son comparables entre si debido a que se usaron diferentes métodos de

diagnóstico y diferentes puntos de corte, nos proporcionan evidencia que muchas especies de animales han sido expuestas a este parásito.

**Cuadro 1.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos a nivel mundial.

País	Región	Nº animales	% positivos	Técnica <sup>a</sup>	Título <sup>b</sup>
Alemania		388	4.1	IFI	1:400
		4,261	27.0	IFI	1:50
Argentina	La Plata	33	51.5	IFI	1:800
		1,048	16.6	IFI	1:200
Australia	Nueva Gales	266	24.0	IFI	1:160
			10.2	ELISA	IDEXX
Brasil	Bahía	447	14.0	IFI	1:200
	Matto Grosso	23	21.7	IFI	1:25
	Río Grande	1,549	17.8	IFI	1:200
	Río de Janeiro	75	22.7	IFI	1:25
	Sao Paulo	521	30.5	ELISA	IDEXX
Chile		198	15.7	IFI	1:200
China		262	17.2	ELISA	CIVTEST
España		1,121	36.8	ELISA	WT-IH
Estados Unidos	California	176	34.0	IFI	1:640
	Oklahoma	1,000	14.7	ELISA	IDEXX
	Maryland	1,029	28.0	IFI	1:200
Italia	Parma	820	28.7	IFI	1:160
Japón		2,420	5.7	IFI	1:200
México	Chihuahua	813	42.0	ELISA	IDEXX
	Jalisco	1,003	56.0	ELISA	WT-IH
Nueva Zelanda		77	46.7	IFI	1:200
Paraguay		297	35.7	ELISA	WT-IH
Perú	Arequipa		57.0		
	Cajamarca		42.9		
	Chachapoyas	265	40.4	IFI	1:200
	Junín	347	12.8	IFI	1:200
	Lima	304	29.6	IFI	1:200
	Pucallpa	268	1.5	IFI	1:200
	Puno	419	18.1	IFI	1:200
Suecia		780	2.0	ELISA	ISCOM
Uruguay		155	61.3	IFI	1:200

**a:** IFI inmunofluorescencia indirecta.

**b:** WT-IH taquizoito puro; CIVTEST Bovis *Neospora* ELISA indirecto taquizoitos lisados; IDEXX HerdCheck *Neospora caninum* ELISA indirecto taquizoitos lisados; ISCOM taquizoitos incorporados a complejos inmunoestimulantes.

Fuente: Dubey *et al.*, 2007

**Cuadro 2.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en caninos a nivel mundial.

País	Región	Nº animales	% positivos	Técnica <sup>a</sup>	Título <sup>b</sup>
Alemania		200	13.0	IFI	1:50
Argentina	Bueno Aires	125	48.0	IFI	1:50
	La Plata	97	47.4	IFI	1:50
Australia	Sydney	150	12.0	IFI	1:50
Brasil	Bahía	415	12.0	IFI	1:50
	Matto Grosso	245	26.5	IFI	1:50
	Minas Gerais	300	10.7	IFI	1:50
	Paraná	134	21.6	IFI	1:50
	Sao Paulo	611	25.0	NAT	1:25
Chile		7	57.0	IFI	1:50
España	Cataluña	139	12.2	IFI	1:50
Estados Unidos		229	2.0	IFI	1:50
		1,079	7.0	IFI	1:50
Italia	Parma	194	28.9	IFI	1:50
Japón		48	31.3	IFI	1:50
México	Hidalgo	27	51.0	ELISA	IDEXX
		30	20.0	ELISA	IDEXX
Nueva Zelanda		161	94.5	IFI	1:50
Perú	Chachapoyas	142	28.9	IFI	1:50
	Lima	104	32.7	IFI	1:50
	Mantaro	124	19.4	IFI	1:50
	Puno	122	14.8	IFI	1:50
Reino Unido		104	5.8	IFI	1:50
Suecia		398	0.5	ELISA	ISCOM
Uruguay		414	20.0	IFI	1:50

**a:** IFI inmunofluorescencia indirecta; NAT test aglutinación *Neospora*

**b:** IDEXX HerdCheck *Neospora caninum* ELISA indirecto taquizoitos lisados; ISCOM taquizoitos incorporados a complejos inmunoestimulantes.

Fuente: Dubey *et al.*, 2007

**Cuadro 3.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en búfalos de agua a nivel mundial.

País	Región	Nº animales	% positivos	Técnica <sup>a</sup>	Título <sup>b</sup>
Argentina	Corrientes	449	64.0	IFI	1:100
Brasil	Bahía	117	35.9	IFI	1:200
	Norte (Pará)	196	70.9	IFI	1:25
	Río Grande	164	14.6	ELISA	CHEKIT
	Sao Paulo	222	64.0	IFI	1:25
			53.0	NAT	1:40
China		40	0	ELISA	CIVTEST
Egipto		75	68.0	NAT	1:20
India		32	34.4	ELISA	VMRD
Irán		181	37.0	ELISA	IDEXX
Italia		1,377	34.6	IFI	1:200
Vietnam		200	1.5	ELISA	ISCOM

**a:** IFI inmunofluorescencia indirecta; NAT test aglutinación *Neospora*.

**b:** CHEKIT *Neospora* ELISA indirecto taquizoitos lisados; CIVTEST Bovis *Neospora* ELISA indirecto taquizoitos lisados; IDEXX HerdCheck *Neospora caninum* ELISA indirecto taquizoitos lisados; ISCOM taquizoitos incorporados a complejos inmunoestimulantes; VMRD *Neospora caninum* ELISA de competencia.

Fuente: Dubey *et al.*, 2007

**Cuadro 4.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en otras especies a nivel mundial.

Hospedero	País	Nº animales	% positivos	Técnica <sup>a</sup>	Título <sup>b</sup>
Gato	Brasil	502	11.9	NAT	1:40
	Italia	282	31.9	NAT	1:40
Camello	Egipto	161	3.7	NAT	1:40
	Irán	120	5.8	IFI	1:20
Cerdo	Alemania	2,041	3.3	ELISA	WT-IH
	Reino Unido	454	0	IFI	1:50
Oveja	Brasil	62	3.2	ELISA	CHEKIT
		305	9.5	IFI	1:50
		597	9.2	IFI	1:50
	Italia	1,010	2.0	ELISA	CHEKIT
		660	0.45	IFI	1:50
Cabra	Brasil	394	6.4	IFI	1:50
	Costa Rica	81	6.1	IFI	1:100
Llama	Perú	81	1.2	IB	
		73	32.9	IFI	1:50
	Alemania	20	0	IB	
Alpaca	Perú	657	2.6	IB	
		78	35.9	IFI	1:50

	Alemania	12	0	IB	
Vicuña	Perú	114	0	IB	
Caballo	Argentina	76	0	NAT	1:40
	Brasil	101	0	NAT	1:40
	Chile	145	32.0	NAT	1:40
	Italia	150	28.0	IFI	1:50
	Estados Unidos	536	11.5	IFI	1:50
Coyote	Canadá	183	27.0	IFI	1:50
	Estados Unidos	52	10.0	IFI	1:25
Zorro	Alemania	122	2.5	IB	
	Canadá	270	34.8	NAT	1:25
	Reino Unido	546	0.9	IFI	1:256

a: IFI inmunofluorescencia indirecta; NAT test aglutinación *Neospora*; IB inmunoblott.

b: WT-IH taquizoito puro; CHEKIT *Neospora* ELISA indirecto taquizoitos lisados.

Fuente: Dubey *et al.*, 2007

## 2.5.2 Factores de Riesgo

### 2.5.2.1 Hospederos

#### a) Hospedero definitivo

Los únicos hospederos definitivos, definidos hasta el momento, son el perro domestico y el coyote, aunque otros cánidos silvestres también pueden ser considerados (McAllister *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 2004). Los perros eliminan ooquistes durante cinco días o más, después de la ingestión de tejidos de animales experimental y naturalmente infectados, y al parecer eliminan más cantidad de ooquistes después de ingerir tejidos bovinos infectados que al ingerir tejidos de ratones, además que los cachorros eliminan más ooquistes que los adultos (Dubey *et al.*, 2007). Un estudio demuestra que el número de ooquistes eliminados por perros infectados naturalmente varia, desde unos pocos a 114,000 por gramo (Schaes *et al.*, 2005); por otro lado uno de cuatro coyotes en cautiverio, eliminaron poca cantidad de ooquistes, después de ingerir tejidos de bovinos infectados experimentalmente; además se encontró ADN de *Neospora caninum* en heces de dos de 85 coyotes y dos de 271 zorros (Gondim *et al.*, 2004; Wapenaar *et al.*, 2006).

#### b) Hospedero intermediario

El parásito, *Neospora caninum* presenta varios hospederos intermediarios, incluyendo rumiantes domésticos y silvestres, equinos, caninos entre otros; dentro de los cuales los más

importantes son los bovinos (McAllister *et al.*, 1998). Así entre los hospederos intermediarios determinados tenemos al ovino (Dubey y Lindsay, 1990), caprino (Barr *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1996), equino (Lindsay *et al.*, 1996), camello (Hilali *et al.*, 1998), ciervo (Gondim *et al.*, 2004), zorro (Almeria *et al.*, 2002), felinos silvestres (Cheadle *et al.*, 1999), y experimentalmente la infección ha sido establecida en diferentes especies de aves (Baker *et al.*, 1995; Furuta *et al.*, 2007).

#### **2.5.2.2 Transmisión**

##### **a) Transmisión Vertical**

La transmisión vertical (transplacentaria) es la principal ruta de transmisión, la más eficiente y la de mayor frecuencia en el ganado bovino, y está relacionada directamente con la propagación y el mantenimiento de la enfermedad en el hato, aunque no está definido si esta ruta es la más importante en los búfalos de agua (Björkman *et al.*, 1996; Antony y Williamson, 2001; Dubey, 2003a). Se demostró que *N. caninum* puede ser mantenido por varias generaciones a un nivel constante de prevalencia, aparentemente sin la necesidad de dispersión de un hospedero definitivo, corroborando la teoría de que la ruta transplacentaria es la más importante en la especie bovina (Dubey *et al.*, 2007).

##### **b) Transmisión horizontal**

A pesar de la eficiencia de la transmisión vertical es evidente, de acuerdo a los modelos teóricos, que la infección no podría mantenerse a niveles constantes en un hato, si no existiera cierto grado de infección postnatal (Davison *et al.*, 1999), es así que un estudio demuestra una falta de asociación en la seropositividad entre madre e hija en hatos con abortos epidémicos (Thurmond *et al.*, 1997). Por otro lado, los terneros recién nacidos pueden adquirir la infección después de ingerir leche contaminada con taquizoitos (Uggla *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 2001), e incluso se ha demostrado ADN de *N. caninum* en leche y calostro (Moskwa *et al.*, 2003, 2007).

La ingestión de ooquistes esporulados de *N. caninum* presentes en el medio ambiente, es el único modo natural demostrado de infección en el ganado bovino después del nacimiento (De Marez *et al.*, 1999; Trees *et al.*, 2002), además algunos estudios realizados en búfalos de agua, sugieren que este tipo de transmisión (ingestión de ooquistes) juega un papel importante en la persistencia de la infección en el hato, y así presentar alto porcentaje de búfalos adultos

seropositivos en comparación con los animales jóvenes (Guarino *et al.*, 2000; Campero *et al.*, 2007; Haji *et al.*, 2007).

La transmisión venérea puede ser posible, pero incierta, según lo evidenciado recientemente en vaquillas infectadas experimentalmente por inoculación intrauterina de semen contaminado con taquizoitos (Serrano *et al.*, 2006); y una respuesta a cierta dosis se ha observado en una titulación experimental con seroconversión y mantenimiento de los niveles de anticuerpos en vaquillas inoculadas con semen contaminado con  $5 \times 10^4$  taquizoitos (Serrano *et al.*, 2007). Aunque ADN de *N. caninum* se ha encontrado en semen de toros naturalmente expuestos, los resultados sugieren que los organismos viables, de estar presentes, son pocos e infrecuentes, además que las vacas inseminadas con semen contaminado con taquizoitos, congelado y deshielado, no adquirieron la infección (Dubey *et al.*, 2007).

#### **2.5.2.3 Parásito**

Dentro de los factores dependientes del parásito que pueden influir en el desarrollo de la infección tenemos al aislado de *Neospora caninum*, el cual se mantiene en cultivo celular; la dosis infectante, el estadio parasitario y la presencia de infecciones concurrentes (Dubey, 2003b). Los aislamientos realizados de diferentes hospederos son genéticamente similares, pero se sabe poco acerca de la variación entre cepas con respecto a la patogenicidad, pudiendo explicarse por los pasajes prolongados en el cultivo que pueden alterar esta y otras características del parásito (Pérez-Zaballos *et al.*, 2005; Bartley *et al.*, 2006), observando que algunas cepas de *Neospora caninum* son más patógenas para ratones, que otras (Dubey *et al.*, 2007); además que una variedad de aislamientos han inducido aborto o infecciones fetales en el ganado bovino (Dubey *et al.*, 2006) y pasajes prolongados en el cultivo pueden alterar la patogenicidad y otras características del parásito (Pérez-Zaballos *et al.*, 2005; Bartley *et al.*, 2006).

#### **2.5.2.4 Edad**

Parece ser que muchos abortos endémicos y esporádicos en las vacas debido a *Neospora caninum* son el resultado de la reactivación de una infección crónica, donde las vacas seropositivas tienen de dos a tres veces más riesgo de aborto que las seronegativas (Puray, 2005). Estudios realizados en novillas y vacas, muestran que existe mayor repercusión en las primeras, ante la infección por *Neospora caninum*, mencionando que la magnitud de infección

por *N. caninum* es más evidente en novillas y decrece con el número de partos, sugiriendo que la inmunidad protectora materna incrementa con la edad (Rodríguez, 2009)

#### **2.5.2.5 Sexo**

Las hembras son más importantes en cuanto al mantenimiento en el hato de la neosporosis, debido a que los estudios realizados demuestran que la infección por *Neospora caninum* es más frecuente en rebaños de aptitud lechera que los de aptitud cárnica (Moore *et al.*, 2001; Dubey, 2003b).

#### **2.5.2.6 Medio Ambiente**

La información acerca de los factores medio ambientales que pueden predisponer a la infección por *Neospora caninum* es escasa, y en general la presentación de abortos e infecciones postnatales se presentan en cualquier época del año, sin embargo se ha observado una mayor frecuencia durante la época de otoño-invierno, debido probablemente a factores inmunodepresores relacionados con la alimentación y estrés (Ortega-Mora *et al.*, 2001).

### **2.5.3 Importancia de la Neosporosis**

#### **2.5.3.1 Importancia económica**

Ante la presentación de infección por *Neospora caninum*, se menciona que el impacto económico depende de los costos directos y los valores de fetos perdidos; los costos indirectos que incluyen el servicio profesional y establecimiento del diagnóstico. Entre los eventos que pueden originar las pérdidas tenemos: muerte fetal temprana con repetición de celo, aborto en el tercio medio de la gestación, muerte neonatal, incremento en el descarte de animales, reducida cantidad de producción de leche/año/animal, reducido valor económico de las hembras para servicio (Moore *et al.*, 2001)

#### **2.5.3.2 Importancia en Salud Pública**

Hasta la actualidad no se ha reportado a *Neospora caninum* como enfermedad zoonótica; sin embargo, se han reportado bajos niveles de anticuerpos (6.7 y 0.4%) en muestras de donadores de California y de granjeros y mujeres con abortos recurrentes en Inglaterra, no mostrando evidencia alguna del parásito ni su ADN en tejido humano (Dubey *et al.*, 2007).



## 2.6 Patogenia

La patogenia de la neosporosis es muy compleja y depende del equilibrio entre la capacidad del taquizoito de penetrar y multiplicarse en las células y la capacidad del hospedero de impedir esa proliferación (Buxton *et al.*, 2002). La invasión de la célula hospedera se realiza mediante un proceso activo en el cual intervienen procesos de motilidad, adhesión a moléculas de superficie y penetración en la célula; donde el evento inicial en el proceso de adhesión del taquizoito es mediado por un contacto de baja afinidad, que subsecuentemente conduce a secreción de micronemas, como consecuencia se desarrolla una unión más específica con los receptores de la superficie celular, rodeándose de la membrana plasmática (vacuola parasitófora) ocurriendo así la entrada en la misma, localizándose intracitoplasmáticamente en los cinco primeros minutos (Hemphill y Gottstein, 1996; Ortega-Mora *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2003). Luego se da la multiplicación activa, ocasionando la destrucción de la célula con la aparición de focos de necrosis, que es la principal manifestación lesional, la respuesta inflamatoria no es purulenta y está constituida por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas; que de perdurar en el tiempo, puede dar lugar a una proliferación de tejido conectivo en la zona (Barr *et al.*, 1991).

Los taquizoitos de *Neospora caninum* interactúan con la célula hospedera por medio de mecanismos altamente conservados en todo el phylum Apicomplexa, y a diferencia de otros géneros de ese phylum, que muestran una considerable especificidad por la célula hospedera, *Neospora caninum* puede invadir y multiplicarse en diferentes tipos de células de mamíferos, sugiriendo así, que pueden reconocer uno o varios receptores de la superficie celular, para la adhesión inicial y la consecuente invasión (Naguleswaran *et al.*, 2002).

*Neospora caninum* es capaz de producir lesiones necróticas visibles en pocos días, causando muerte celular por la activa multiplicación de los taquizoitos, pudiendo producir enfermedades neuromusculares graves en caninos, bovinos y probablemente en otras especies, destruyendo un gran número de células nerviosas, incluyendo nervios craneales y espinales, afectando así la conductibilidad de esas células (Cantile y Arispici, 2002).

### 2.6.1 Patogenia del aborto

El aborto originado por *N. caninum*, puede presentarse entre los tres y nueve meses de gestación, y se produce luego de una parasitemia de la madre con una posterior invasión de las células en el útero grávido por parte del parásito y un posible daño a la placenta, donde los fetos

abortados, frecuentemente autolíticos no suelen presentar lesiones macroscópicas características además de no presentar retención de placenta (Buxton *et al.*, 2002). Los factores que pueden conducir al desarrollo del aborto son diversos: momento de la gestación en el que se produce la parasitemia (Buxton *et al.*, 2002), cantidad y duración de la parasitemia, eficacia de la respuesta inmune maternal, capacidad del feto para desarrollar respuesta inmune y las características del aislado de *Neospora caninum* (Innes *et al.*, 2002).

El feto es especialmente vulnerable durante el primer tercio de gestación, debido a que su sistema inmune se encuentra inmaduro (Buxton *et al.*, 2002), en el segundo tercio ocurren la mayoría de los abortos debido a que el feto presenta una respuesta inmune elemental e insuficiente para superar la infección (Gonzalez *et al.*, 1999) y en el último tercio de gestación, la infección trae como consecuencia el nacimiento de terneros clínicamente sanos pero congénitamente infectados, esto debido a que el feto desarrolla una respuesta inmune competente contra el parásito.

Es conocido que el parásito al invadir las células uterinas, se multiplica y causa una destrucción local tanto en los tejidos del feto como los de la madre, iniciando así una respuesta inflamatoria, donde las lesiones se extienden hacia la región corio-alantoidea, entre los cotiledones, entrando el parásito en la corriente sanguínea del feto e invadiendo otros tejidos, mostrando una predilección por el sistema nervioso central, localizándose alrededor de los vasos sanguíneos, además de la destrucción de otros tejidos, como corazón, músculo esquelético, pulmón e hígado, debido a la inflamación de tipo linfóide (Barr *et al.*, 1994a).

Si el hospedero cuenta con una buena respuesta inmune, los taquizoitos se transforman en bradizoitos, formando los quistes tisulares (fase crónica), localizándose principalmente en el sistema nervioso central. Entretanto, algunos factores como por ejemplo el periodo de gestación, puede conllevar a una baja en la inmunidad y reactivar la infección, así, los bradizoitos se transforman en taquizoitos desencadenando una infección aguda (Quinn *et al.*, 2002).

## **2.7 Inmunidad**

Para entender lo concerniente a la respuesta inmune que desarrolla tanto la madre como el feto en la infección con *Neospora caninum*, se debe tener presente: inmunidad de la madre durante la gestación; inmunidad en las infecciones por *N. caninum*; e inmunidad durante la gestación con infección por parte del parásito.

### **2.7.1 Aspectos inmunes durante la gestación**

Sabiendo que la gestación está condicionada por mecanismos de tolerancia o rechazo, la madre durante esta etapa adapta su metabolismo y sistema inmune, proporcionando un medio homeostático y nutriente al “concepto” (placenta, feto y fluidos), que pueden ser perturbados debido a factores ambientales externos (infecciones o estrés) ocasionando el aborto. (Thellin y Heinen, 2003).

Favorecida por los altos niveles de progesterona, la respuesta inmune mediada por linfocitos helper tipo 2 (Th2) mantiene la gestación mediante la producción de interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10) y reducción de la producción de moléculas pro-inflamatorias como IL-12 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), las cuales son perjudiciales para la vida fetal (Raghupathy, 1997; Clark *et al.*, 1999). Uno de los mecanismos más importantes de rechazo al feto implica un desbalance entre la respuesta Th1/Th2 a favor de la respuesta Th1 y producción de IFN- $\gamma$  y otras citocinas, como las interleucinas IL-2, IL-3, y IL-12, que promueven actividades citolíticas en macrófagos y linfocitos natural killer (NK), además de activar la protrombina facilitando la coagulación y la trombosis (Hill *et al.*, 1995; Raghupathy, 1997).

### **2.7.2 Aspectos inmunes en infecciones por *N. caninum***

Se dan dos tipos de respuesta inmune: una respuesta inmune humoral y otra mediada por células.

#### **2.7.2.1 Inmunidad humoral**

El tipo de respuesta inmune celular generada determina la producción de Igs, observando que una respuesta celular Th1 estimula la producción de IgG2 mientras que una respuesta celular Th2 regula, mediante la secreción de IL-4, la producción de IgG1 (Tizard, 1992). En animales experimental y naturalmente infectados, la avidéz de la IgG tiende a incrementarse con el curso de la infección, permitiendo la identificación de animales crónica o recientemente infectados (Baszler *et al.*, 1999).

Se cree que el desarrollo de anticuerpos específicos probablemente limita la parasitemia o facilita la lisis de los taquizoítos extracelulares (Hemphill, 1999b). De este modo, ratones deficientes de células B y de anticuerpos, que fueron inoculados con *N. caninum*, murieron presentando lesiones de encefalitis necrotizante multifocal; además, diferentes estudios han

descrito que luego de la infección por *N. caninum*, los anticuerpos predominantes, en ratones, son del isotipo IgG2 siendo bajos o nulos los niveles de IgG1 (Eperon *et al.*, 1999). Estos hallazgos coinciden con lo evidenciado en bovinos experimentalmente infectados, en los cuales existió una respuesta dependiente de células Th1 asociada a la producción de IgG2 (Williams *et al.*, 2000).

#### **2.7.2.2 Inmunidad mediada por células**

La inmunidad mediada por células (IMC) desempeña un papel importante en infecciones a *Neospora caninum* por ser este un organismo intracelular, observando que la respuesta inmune relacionada con la protección es principalmente de tipo Th1, mediado por IL-12, con la producción de interferón gamma (INF- $\gamma$ ), IL-2, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la presencia de células NK también productoras de INF- $\gamma$ . Estos linfocitos Th1 son activados por epitopes expresados en la superficie de células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), asociados a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II, promoviendo la respuesta citolítica y la inmunidad celular mediada por anticuerpos; asimismo cuando las proteínas antigénicas se procesan en el interior de las células, los epitopes también son presentados a los linfocitos citotóxicos (Lc) asociados a moléculas del CMH 1 (Hemphill *et al.*, 2006).

Diferentes estudios demuestran que INF- $\gamma$  juega un papel importante en el control de la infección por *Neospora caninum*. Así, se demostró que el tratamiento de fibroblastos con INF- $\gamma$  recombinante causa una significativa inhibición de la multiplicación intracelular de *N. caninum*, además se comprobó un aumento del INF- $\gamma$  después de la infección experimental en bovinos, asimismo el cultivo de células de cerebro bovino que es altamente susceptible a la infección por *N. caninum* puede ser inhibida por adición de IFN- $\gamma$  y FNT (Innes *et al.* 1995; Williams *et al.*, 1997; Yamane *et al.*, 2000). Experimentos realizados con ratones han permitido caracterizar no sólo la inmunidad mediada por células sino también la dinámica de las citocinas durante las infecciones por *N. caninum*, comprobando que la susceptibilidad de estos animales puede ser aumentada mediante la neutralización de IL-12 e IFN- $\gamma$ , que resultan un hallazgo constante luego de las infecciones experimentales, aunque la IL-12 por si sola, no es capaz de impedir el progreso de la enfermedad; además la IL-10, involucrada en la respuesta Th2, ha sido asociada a la depleción de IFN- $\gamma$  presente en ratones susceptibles a *N. caninum* (Khan *et al.*, 1997; Kasper y Khan, 1998; Baszler *et al.*, 1999; Eperon *et al.*, 1999). Finalmente, resulta de interés el rol del óxido nítrico (ON), producido por macrófagos activados, que tiene diversas funciones entre las cuales se mencionan la inmunosupresión y la destrucción de parásitos intracelulares,

observando que ratones deficientes en óxido nítrico sintetasa, enzima que produce ON, son susceptibles a *N. caninum* (Tizard, 1992; Tanaka *et al.*, 2000).

### **2.7.3 Inmunidad, gestación e infección por *N. caninum***

Existen dos teorías que explican la resistencia de la hembra gestante con infección por *Neospora caninum*: primero, la preñez favorecida por una respuesta Th2 compromete la resistencia al parásito ocasionando parasitemia e infección transplacentaria; segundo, una eficiente respuesta Th1 hacia el parásito podría comprometer la preñez (Quinn *et al.*, 2002). Un estudio en fetos y vaquillonas inoculadas a los 110 días de gestación describe un balance entre las respuestas Th1/Th2, sugiriendo que la infección del hospedero podría ser favorecida por la expresión de IL-4 e IL-10 (respuesta Th2) (Almeria *et al.*, 2003).

Roberts *et al.* (2001) proponen que la madre puede controlar la infección durante el primer trimestre de gestación, debido a que presenta una respuesta Th1 bien establecida, siendo bajos los niveles de progesterona y la respuesta Th2; por otro lado, la transmisión vertical ocurre durante el tercer trimestre cuando los altos niveles de progesterona asociada a la respuesta Th2 son incapaces de controlar al protozoo.

Se ha mencionado que la baja avidez de anticuerpos no necesariamente está asociada con una reciente infección por *N. caninum* aunque puede ser un indicador de riesgo de aborto, observando que durante un brote de abortos ocasionado por *N. caninum*, las vacas crónicamente infectadas resultaron menos propensas a problemas reproductivos que vacas infectadas recientemente, siendo baja la avidez de la IgG en este último grupo (McAllister *et al.*, 2000; Sager *et al.*, 2003); describiéndose además que hembras con altos títulos séricos hacia el final de la gestación, parían terneros clínicamente normales pero congénitamente infectados, sin embargo cuando los títulos séricos se incrementaban durante la mitad de la gestación existían altas probabilidades que se produzca el aborto (Paré *et al.*, 1997; Guy *et al.*, 2001).

La transmisión congénita de *N. caninum* o la ocurrencia de aborto en bovinos está relacionada con el momento de la gestación en que la madre es infectada (Williams *et al.*, 2000), observando que hembras infectadas con *N. caninum* a los 70 días de gestación, presentaron una sólida respuesta IMC, y todos los terneros nacidos de estas vacas resultaron seronegativos no presentando evidencia de respuesta IMC; sin embargo, terneros nacidos de hembras infectadas a los 140 y 210 días de gestación fueron seropositivos y presentaron una respuesta IMC positiva detectada en células mononucleares de sangre periférica (CMSP),

células del bazo y células de ganglios hepáticos, mesentéricos y retro-faríngeos; sugiriendo así que la IMC de bovinos infectados durante el primer tercio de gestación protege de la infección fetal, y que ésta ocurriría durante el segundo y tercer trimestre de gestación, siendo posible el aborto y el nacimiento de terneros congénitamente infectados, respectivamente (Hemphill *et al.*, 2000).

Considerando que el feto bovino puede reaccionar inmunológicamente a los 120-160 días (Tizard, 1992), recientes estudios determinaron la respuesta fetal en los casos de neosporosis, encontrando en fetos bovinos infectados experimentalmente con *N. caninum* a los 159 y 169 días de gestación, el desarrollo de una respuesta humoral detectada por Inmunofluorescencia indirecta (IFI), aunque la IMC determinada por pruebas de linfoproliferación y producción de IFN- $\gamma$  fue variable entre los fetos; además ambas respuestas, humoral y celular, no fueron suficientes para impedir la infección fetal en ninguno de los animales, ni tampoco existió correlación entre la respuesta celular y la severidad de las lesiones fetales (Anderson *et al.*, 2000).

En conclusión, luego que una hembra bovina ingiere ooquistes o sufre una reactivación, los factores que influyen la infección fetal serían: el modo de infección de la madre, el momento de la gestación, la respuesta inmune materna y la respuesta inmune del feto. Así, un balance a favor de una respuesta Th1 durante el primer trimestre de gestación controlaría la infección pero resultaría nociva en la interfase materno-fetal; por otro lado, el balance a favor de una respuesta inmune Th2 observada en el segundo trimestre de gestación no permitiría controlar la infección y el parásito ocasionaría lesiones inflamatorias no sólo en la placenta sino también en el feto, y por último, durante el tercer trimestre de gestación se observaría infección congénita siendo menor la probabilidad de que ocurra un aborto debido a la maduración del sistema inmune fetal (Innes *et al.*, 2002).

## **2.8 Signos Clínicos**

El aborto es el único signo clínico observado en hembras gestantes infectadas (vacas o vaquillonas), y puede ocurrir entre el tercer mes hasta el final del período de gestación, sin embargo la mayoría de las pérdidas se producen entre el quinto y sexto mes; además se sabe que hembras con anticuerpos contra *Neospora caninum* son más predispuestas a abortar que las seronegativas (Anderson *et al.*, 1991; Dubey, 2003b). Se desconoce si *Neospora caninum* ocasiona pérdidas tempranas de preñez, sin embargo, la infección experimental de vacas a distintos meses de gestación, mostró que la parasitemia durante las primeras dos semanas

resultó en un desarrollo anormal del feto y reabsorción de los tejidos fetales en un período de tres semanas siguientes a la infección, y por el contrario, las infecciones producidas a las 30 semanas de gestación dieron como resultado el nacimiento de terneros congénitamente infectados pero sin signos clínicos, siendo esto observado comúnmente (Williams *et al.*, 2000).

El feto muerto en el útero puede ser reabsorbido, momificarse, o expulsarse con avanzado grado de autólisis, y aunque no es patognomónico, la momificación es un hallazgo frecuente habiéndose descrito en casos naturales (Wouda *et al.*, 1998) y experimentales (Barr *et al.*, 1994b). Por otro lado, los terneros infectados en el útero, pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento (Barr *et al.*, 1991; Dubey y Lindsay, 1996), mostrando al examen clínico debilidad, falta de crecimiento, ataxia, flexión o hiperextensión de miembros anteriores, parálisis completa de los miembros, disminución del reflejo patelar o falta de sensibilidad propioceptiva, exoftalmia o asimetría ocular (Campero *et al.*, 1998; Dubey, 1999).

En los caninos, la neosporosis se manifiesta de forma generalizada, afectando incluso la piel, ocasionando una dermatitis que puede ser severa afectando a perros de cualquier edad; encontrando cuatro casos reportados de neosporosis cutánea incluyendo una infección mixta con *Leishmania* sp. en un solo perro (Perlé *et al.*, 2001; Tarantino *et al.*, 2001; Ordeix *et al.*, 2002; Georgieva *et al.*, 2006). Los animales jóvenes o las crías congénitamente infectadas presentan paresia de los miembros posteriores, que puede progresar a una parálisis, se observa también hiperextensión rígida, además de otras disfunciones como diarrea acompañada de liberación de ooquistes, dificultad para deglutir, parálisis de las mandíbulas, flacidez, atrofia muscular y falla cardíaca; no se conoce acerca de la predisposición de la raza y el sexo, sin embargo, se han descrito más casos en Labradores Retrievers, Boxers, Golden Retrievers, Basset Hounds (Dubey, 2003b).

En los rumiantes menores, ovinos y caprinos, la infección se da de forma experimental, reportándose un caso de neosporosis congénita en un cordero, el cual nació débil, parcialmente atáxico, y murió a la semana de edad (Dubey, 1990), además existen reportes de abortos en cabras, además del nacimiento de crías muertas o débiles (Barr *et al.*, 1992).

## **2.9 Lesiones**

*Neospora caninum* causa muerte celular acompañada por lesiones necróticas visibles en varios días, debido a una activa replicación de los taquizoitos, provocando daños en la conductividad nerviosa-muscular, causado por la destrucción de células nerviosas, así como

daño cerebral y de la médula espinal (Georgieva *et al.*, 2006). Un estudio determinó que 82 fetos bovinos presentaron encefalitis y miosistis como lesiones predominantes, seguido de adrenalitis, nefritis, hepatitis, placentitis y neumonía (Barr *et al.*, 1991); por otro lado, en caninos se observa neumonía, pancreatitis, hepatitis, dermatitis (úlceras cutáneas focales), miositis, miocarditis, megaesófago (Barber, 1998).

### **2.9.1 Lesiones histopatológicas**

Se observa inflamación del sistema nervioso central (SNC), cerebro y médula espinal. En el cerebro la inflamación se distribuye multifocalmente, con zonas de necrosis y atrofia, observando además una meningitis, meningoencefalomielitis no supurativa multifocal, además de gliosis focal asociado a cuadros de malacia alrededor de los quistes tisulares (Cantile y Arispici, 2002).

Las lesiones observadas en bovinos y caninos incluyen: miositis necrotizante multifocal del músculo cardíaco, además la lesión miocárdica puede presentar autólisis; lesiones hepáticas que consisten en un edema portal con degeneración hidrópica, infiltrado de células mononucleares a nivel periportal, además de focos de necrosis hepatocelular; a nivel pulmonar se observa necrosis focal con exudado fibrinoso e infiltración de células inflamatorias además de hiperplasia epitelial alveolar; además de otras lesiones observadas como nefritis intersticial focal, pancreatitis necrotizante multifocal y una severa dermatitis, reportada sólo en perros, con presencia de úlceras cutáneas focales o multifocales donde se observan taquizoitos además de necrosis (Barber, 1998; Basso *et al.*, 2005; Mc Allister, 2005).

En terneros, puede observarse zonas pálidas a oscuras con focos de necrosis en el cerebro, que consisten en encefalomielitis no supurativa multifocal o difusa a nivel de meninges y a veces con calcificación (Dubey, 2003b). Además, en fetos de búfalos se observa procesos inflamatorios no supurativos en corazón, cerebro, riñón, músculo, hígado, y quistes compatibles a *Neospora caninum* en cerebro (Guarino *et al.*, 2000). Por otro lado, en gatos, se observó experimentalmente encefalomielitis, polimiositis y hepatitis (Puray, 2005)

### **2.10 Diagnóstico**

El diagnóstico se basa en la historia clínica, signos clínicos, epidemiología, lesiones macroscópicas y microscópicas (histopatología), además de pruebas complementarias: serológicas y no serológicas (Rodríguez, 2009).



### 2.10.1 Diagnóstico Serológico

La identificación de anticuerpos a *Neospora caninum* en un animal es indicativo de exposición al protozoo (Dubey, 1999); para esto se utilizan diversas pruebas serológicas tales como: el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), y la aglutinación directa han sido utilizadas para demostrar anticuerpos en el suero o en el fluido corporal de fetos.

#### 2.10.1.1 Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

La técnica de ELISA ha sido ampliamente utilizada en el serodiagnóstico de la neosporosis, debido a la facilidad para procesar un gran número de muestras, alta sensibilidad y especificidad, sumado a la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, haciendo confiable a esta prueba (Moore *et al.*, 2001). Existen modificaciones de ELISA que utilizan distintos tipos de antígenos como: taquizoitos sonicados (aplicación de ultrasonido, cuya agitación provoca destrucción de membrana celular), taquizoitos fijados con formalina, antígenos recombinantes y antígenos incluidos en partículas iscom (Williams *et al.*, 1997).

Dentro de los tipos de ELISA, el más utilizado es ELISA indirecto, el cual emplea antígeno soluble de taquizoito, mezcla de antígenos intracelulares y de membrana de los diferentes aislados de *Neospora caninum* BPA1 y NC-1; puede ser usado con muestras de suero, leche y líquidos fetales para la detección de anticuerpos, además los resultados pueden ser expresados como valores de Densidad Óptica (OD), valores Porcentuales de Positividad (PP), o valores de cociente entre Muestra/Control Positivo (S/P) (Ortega-Mora *et al.*, 2006). Otro tipo de ELISA es el de avidez, el cual es una modificación del ELISA indirecto, que permite analizar la avidez de IgG, basado en el hecho de que los primeros anticuerpos sintetizados después de la infección primaria tienen baja afinidad con respecto a los producidos posteriormente, los cuales se relacionan con infección crónica, resultando útil como herramienta para investigar la duración de la infección (Björkman *et al.*, 1999, 2005; Ortega-Mora *et al.*, 2006).

El ELISA Iscom, utilizado por primera vez en el diagnóstico de la infección en el perro, emplea partículas “iscoms” que son estructuras de 40nm compuestas por Quil A (un derivado de saponina), colesterol, fosfolípidos y a las que se le añade el antígeno, el cual contiene extractos proteicos de membrana y de compartimientos intracelulares, cuyo peso varía entre 18-61kDa, proveniente de taquizoitos de *Neospora caninum* NC-1; incrementando la especificidad del ELISA, logrando disminuir el número de proteínas intracelulares causantes de uniones

inespecíficas o reacciones cruzadas (Björkman *et al.*, 1994). Entre otros tipos de ELISA tenemos: ELISA de competición, que consiste en una prueba indirecta en la cual se utiliza un anticuerpo monoclonal que compite con los anticuerpos específicos del suero problema por los epítomos disponibles del antígeno fijado en la placa (Baszler *et al.*, 1996) y ELISA sandwich, desarrollado por Schares *et al.*, (1999) para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos.

#### **2.10.1.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue el primer método aplicado para el diagnóstico serológico con el fin de detectar neosporosis (Dubey *et al.*, 1988), siendo considerada como la técnica de referencia estándar en la neosporosis, con la cual han sido comparadas otras técnicas serológicas (Ortega-Mora *et al.*, 2006), y en la actualidad se emplea fundamentalmente en estudios epidemiológicos para detectar anticuerpos anti-*Neospora caninum* en un gran número de especies animales como: perro, zorro, gato, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos de agua, equinos, roedores y primates (Dubey y Lindsay, 1996; Björkman y Uggla, 1999). En esta técnica, los taquizoitos de *Neospora caninum* (origen bovino o canino) son cultivados en diferentes líneas celulares, y después de un procesamiento adecuado son fijados en láminas de microscopia, que son incubadas inicialmente con sueros diluidos, y en un segundo periodo con anticuerpos marcados con fluoresceína (conjugado anti-IgG), el cual va dirigido contra las inmunoglobulinas del suero problema; considerándose resultado positivo cuando se observa la fluorescencia en toda la superficie del taquizoito, y negativo cuando la fluorescencia queda restringida a la parte apical del taquizoito (Björkman y Uggla, 1999). Es preciso mencionar que el desarrollo de esta técnica requiere de entrenamiento y experiencia, y los resultados dependen de la subjetividad del lector.

#### **2.10.1.3 Aglutinación Directa (DAT)**

La técnica de Aglutinación Directa es una prueba serológica relevante en el diagnóstico de la neosporosis, demostrando ser bastante específica, teniendo como características el no requerir conjugados de difícil adquisición siendo empleado en un amplio rango de hospederos, tiene alta repetibilidad entre operarios, es barata, de fácil lectura y utiliza poco equipamiento y materiales (Romand *et al.*, 1998). El principio de esta técnica se basa en el uso de taquizoitos aislados de *Neospora caninum* BPA-1 y Nc-1 fijados en formalina, los cuales mediante procesos de dilución del suero con solución de fosfato salino buferada (PBS) con un pH de 7.2, aglutinan

ante la presencia de anticuerpos específicos, destruyendo las IgM mediante el tratamiento con mercaptenol, detectando únicamente las IgG (Packham *et al.*, 1998; Romand *et al.*, 1998).

#### **2.10.1.4 Inmunoblot (IB)**

Esta técnica es usada en combinación con otras técnicas, mas que como una herramienta individual, siendo considerada una técnica esencial para la determinación de antígenos inmunodominantes (Atkinson *et al.*, 2000). Para el caso de animales infectados con *N. caninum* reconocen predominantemente antígenos con un peso molecular de 17, 29-30 y 37Kda. En IB un resultado es considerado positivo cuando dos o tres de cuatro antígenos inmunodominantes están presentes (Bjerkas *et al.*, 1994).

#### **2.10.1.5 Prueba Rápida Inmunocromatográfica (ICT)**

En el 2005 se reportó el desarrollo de una prueba inmunocromatográfica empleada con antígeno de superficie recombinante-1 de *Neospora caninum* (NcSAG1), para la detección rápida de anticuerpos específicos contra *N. caninum*, en el ganado, presentando buena correlación con la técnica de ELISA. El ICT es un método simple, rápido, características que lo hacen ideal para aplicaciones clínicas y de campaña; sin embargo desde su reporte en el 2005, no se han presentado mayores estudios en cuanto a esta prueba rápida (Rodríguez, 2009).

### **2.10.2 Diagnóstico no Serológico**

#### **2.10.2.1 Aislamiento del parásito**

El primer aislamiento de *Neospora caninum* fue logrado a partir de material del sistema nervioso central obtenido de un perro infectado, posteriormente se reporta en California por primera vez un aislamiento a partir de un feto bovino abortado (Moore *et al.*, 2001). *Neospora caninum* ha sido cultivado *in vitro* con monocitos bovinos, células endoteliales de arteria cardiopulmonar bovina, células de riñón bovino, fibroblastos humanos, células Vero (células renales de mono verde africano) y otras líneas celulares en donde sólo taquizoítos han sido observados, manteniéndose infectivos hasta por ocho años; además la criopreservación de taquizoítos en nitrógeno líquido es una alternativa válida sin pérdida de la infectividad para los cultivos celulares (Dubey y Lindsay, 1996; Moore *et al.*, 2001).

#### **2.10.2.2 Examen Histopatológico**

La histopatología sobre tejidos bovinos fetales resulta una técnica diagnóstica relevante en las infecciones a *Neospora caninum*. Las muestras para remitir al laboratorio son: cerebro, pulmón, corazón, hígado, bazo, riñón, músculo estriado; que son fijados en formalina al 10%, para luego fijarse en parafina, teñirse con hematoxilina-eosina (H-E) y ser vistas al microscopio (Basso *et al.*, 2005), observando presencia de lesiones características del parásito como meningoencefalitis necrotizante multifocal, miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía, y adrenalitis focales no supurativas caracterizadas por la presencia de células mononucleares (Rodríguez, 2009).

#### **2.10.2.3 Inmunohistoquímica (IHQ)**

La inmunohistoquímica (IHQ), realizada sobre tejidos fetales formolizados con lesiones histopatológicas compatibles, permite la identificación de *Neospora caninum* con alta especificidad, adquiriendo valor diagnóstico relevante; y aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente. En esta técnica puede emplearse tanto anticuerpos específicos monoclonales o policlonales anti-*Neospora caninum* (Moore *et al.*, 2001).

#### **2.10.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La técnica PCR ha permitido un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas por ser extremadamente sensible y específica, y en el diagnóstico de la neosporosis bovina, su impacto ha sido notable permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos, sin embargo no es una técnica de rutina por su elevado costo. Esta técnica se basa en la identificación y amplificación de algún segmento de ADN que este presente en todos los estadios del ciclo biológico en una gran variedad de tejidos, permitiendo diferenciar a *Neospora caninum* de otros protozoos (Dubey, 1999; Moore *et al.*, 2001).

Para el desarrollo de la técnica se emplean muestras de animales muertos (Eperon *et al.*, 1999), además pueden ser diagnosticadas muestras de animales vivos naturalmente infectados, utilizando PCR en tiempo real, en abortos infectados y vaquillas gestantes, mostrando que existe una mayor concentración de ADN parasitario en el cerebro, comparado con la sangre (Okeoma *et al.*, 2004).

## 2.11 Tratamiento

Existe información acerca de la sensibilidad *in vitro* de *Neospora caninum* a ciertos antimicrobianos, reportando que de un total de 43 sustancias probadas, 17 ocasionaron una reducción total del número de taquizoítos cultivados *in vitro*, observando que entre las drogas más efectivas se encuentran la clindamicina, diclazuril, robenidina y pirimetamina; sin embargo la eficacia de dichas drogas en bovinos no ha sido aún estudiada (Lindsay *et al.*, 1994). Por otro lado, la administración de monensina a razón de 40-120mg/cabeza/día no resultó efectiva en bovinos naturalmente infectados (Moore *et al.*, 2001); además, recientemente se ha informado que utilizando toltrazuril y ponazuril, los cuales son derivados de una droga llamada triazinona utilizada en el tratamiento de las coccidiosis, se logró disminuir las lesiones cerebrales de terneros inoculados experimentalmente, quedando demostrado que actualmente no existe tratamiento en los bovinos que los libere de la enfermedad (Moore *et al.*, 2005b).

La neosporosis neonatal canina caracterizada por paresias y parálisis del tren posterior, puede ser tratada con clindamicina oral en dosis de 12.5 a 18.5mg/kg PV suministrada dos veces al día durante dos a cuatro semanas. También resulta eficaz la combinación de pirimetamina y sulfonamidas en dosis de 0.25 a 0.5 y 30mg/kg PV respectivamente cada 12 horas en forma oral durante cuatro semanas (Moore *et al.*, 2001).

## 2.12 Control y Prevención

Ambos, control y prevención, van dirigidos a reducir la infección post natal y congénita con *Neospora caninum*.

### 2.12.1 Medidas de Control

La restricción de la infección post natal, va enfocado en disminuir el riesgo de infección con la ingestión de ooquistes eliminados en las heces del hospedero definitivo, restringiendo el acceso de los perros a las fuentes de agua, pasturas, galpones y silos donde se almacene alimento para los bovinos; además de recolectar los fetos abortados y placentas para eliminarlos a fin de evitar la fuente de infección para los caninos (McAllister *et al.*, 19998; Moore *et al.*, 2001).

Como la transmisión congénita se da comúnmente en el ganado bovino, se sugieren medidas de manejo como: no dejar crías de animales seropositivos para reposición, dado su alto

riesgo de ser congénitamente infectados; reponer animales seronegativos a neosporosis en el hato, realizar análisis serológico a todo animal nuevo que ingrese al establecimiento para así identificar animales seropositivos a neosporosis; realizar un seguimiento del desempeño reproductivo del hato, con el fin de detectar pérdida de gestación; efectuar un análisis serológico del hato para identificar animales seropositivos; aislar animales seropositivos y que posean al menos un aborto; en establecimientos donde se realice la transferencia de embriones, deberá utilizarse receptoras seronegativas a la enfermedad; recuperar fetos y placentas abortados para enviarlos a centros de diagnóstico con la finalidad de determinar el agente infeccioso (Moore *et al.*, 2001)

### **2.12.2 Prevención: perspectivas para la vacunación**

Si bien las pérdidas reproductivas pueden presentarse más de una vez en gestaciones subsiguientes, las tasas de repetición de aborto por neosporosis son relativamente bajas (menores al 5%) (Anderson *et al.*, 19991; Wouda *et al.*, 1998). Estudios no sólo experimentales (Williams *et al.*, 2003) sino también de campo (McAllister *et al.*, 2000) avalan la presencia de mecanismos inmunes que protegen contra el aborto en bovinos crónicamente infectados. Aunque un inmunógeno capaz de inducir una respuesta inmune comparable a la observada en bovinos crónicamente infectados no evitaría la infección o la transmisión vertical, podría resultar de interés para evitar el aborto; así se observa en un estudio, que la respuesta inmune humoral y celular generada por la inoculación de taquizoítos inactivados en vaquillonas durante el segundo tercio de gestación, fue comparada con aquella observada en animales crónicamente infectados, resultando ambos grupos similares en términos de la generación de anticuerpos específicos y producción de IFN- $\gamma$  (Moore *et al.*, 2005a).

Para evitar la infección postnatal posiblemente sea necesario el desarrollo de vacunas orales capaces de generar una respuesta inmune a nivel de mucosa gastrointestinal, la cual podría limitar el acceso al sistema linfático y gastrointestinal. Diversos antígenos, asociados a los gránulos densos, micronemas y otras proteínas de superficie de los taquizoítos, serían capaces de inducir una respuesta inmune de protección, además diversos clones de ADN pertenecientes a estos antígenos han sido descritos y permitirían el desarrollo de vacunas a sub-unidades (Jenkins, 2001).

Habría ventajas y desventajas al usar una vacuna viva o una vacuna inactivada en la neosporosis bovina, ya que al utilizar una vacuna viva, el protozoo replicaría dentro de las células ocasionando que el antígeno parasitario sea presentado con antígenos del Complejo

Mayor de Histocompatibilidad 1 (CMH 1) estimulando a los linfocitos T CD8, los cuales son importantes en los mecanismos de protección (Kasper y Khan, 1998); caso contrario ocurriría al aplicar una vacuna inactivada, por ejemplo taquizoítos de *N. caninum*, donde se estaría estimulando el procesamiento de un antígeno exógeno. En el caso de la enfermedad natural se generaría el procesamiento de antígenos endógenos por ser *N. caninum* un parásito intracelular obligado, siendo de esta manera diferente la respuesta celular generada. Sin embargo, queda por dilucidarse si una vacuna, aun siendo inactivada, no protege contra el aborto en hatos naturalmente expuestos, más aún, existen graves desventajas al usar una vacuna viva existiendo posibilidad de ocasionar infección crónica y transmisión vertical persistente (Moore *et al.*, 2005b).

La seguridad e inocuidad de una vacuna inactivada debería compensarse con el desarrollo de un apropiado adyuvante con adecuado sistema de liberación que garantice una buena respuesta inmune. Se ha descrito que un inmunógeno inactivado genera altos títulos de anticuerpos séricos, siendo inocuo y seguro. Una vacuna inactivada con Havlogen como adyuvante (NeoGuard®) ha sido recientemente aprobada por el Departamento de Agricultura de los EE.UU; y el laboratorio Intervet describe en su boletín técnico que la vacuna es segura para su uso en bovinos preñados sanos. En uno de sus ensayos, vaquillonas preñadas vacunadas con dos dosis a los 56 y 77 días de gestación en forma subcutánea (SC) fueron posteriormente desafiadas con un inóculo intramuscular a los 95 días de gestación, mostrando que el grupo de 18 animales sin inmunizar tuvo una tasa de abortos del 22%, mientras que las 18 vaquillonas inmunizadas tuvieron terneros vivos y sanos. Por otro lado, se demostró que aquel inmunógeno no previene la transmisión vertical de *Neospora caninum* en bovinos (Moore *et al.*, 2005b). Los actuales inmunógenos comerciales ocasionan la producción de anticuerpos anti-*N. caninum* los cuales no pueden ser diferenciados de aquellos producidos en infecciones naturales; más aún, existe controversia debido a la utilización de la vacuna debido a que la eliminación de animales seropositivos a la enfermedad ha sido sugerida como medida de control.

### **2.13 Crianza de Ganado Bupalino en Jenaro Herrera**

El Distrito Jenaro Herrera (antes llamado pueblo Jenaro Herrera) fue fundado en el año 1954, y desde hace 18 años se viene consolidando la crianza del ganado bupalino, promovido por el Ministerio de Agricultura por medio del Centro de Desarrollo Ganadero de Loreto (CEDEGAL), el mismo que realizó la primera entrega al colegio agropecuario de la ciudad. El Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP) años después trabajó con un método

de crianza de ganado bubalino, logrando buenos resultados, pero no continuó el fomento de la crianza por algunos aspectos de política institucional (Isuiza *et al.*, 1996).

La crianza del búfalo de agua, con propósito lechero, es el que predomina en el distrito. La Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) realizó en 1966 la introducción del búfalo de agua en la llanura amazónica peruana, con la primera importación de 21 búfalos (19 hembras y dos machos) provenientes de la Isla Marajó, Brasil; en 1976 se realizó la segunda introducción, llevada a cabo por la UNAP en convenio con el ministerio de Agricultura, trayendo 107 animales (99 hembras y 8 machos), con el fin de conocer las características y habilidades del búfalo de agua; en 1981, el Ministerio de Agricultura llevó a cabo la tercera importación, donde fueron adquiridos 432 animales; la cuarta introducción se efectuó entre 1983 y 1984, por parte del Gobierno Regional de Loreto, que adquirió 2067 animales provenientes de Río Grande (Brasil), que fueron entregados a criadores de la región, siendo los animales mestizos de las razas Murrah y Jafarabadi. Los primeros búfalos de agua llegaron a Jenaro Herrera en el mes de julio de 1978, mediante un convenio entre el Proyecto de Asentamiento Rural Integral - Jenaro Herrera (PARI-JH) y la UNAP (Isuiza *et al.*, 1996).

Actualmente en Jenaro Herrera, son 25 los criadores de búfalos, conformando un 99% de personas dedicadas a esta actividad, gracias al apoyo del fondo rotatorio implementado por el Ministerio de Agricultura, el cual consiste en un crédito que concede en especie a la persona interesada animales para la crianza con 3 años de gracia y desde el cuarto al sexto año comienza la devolución, en animales, que van a beneficiar a otras personas. El tipo de explotación que predomina es la extensiva, y sólo cuatro productores emplean el tipo de explotación semi-intensiva; se puede decir que esta zona es potencialmente apta para la cría de ganado bubalino, para la producción de carne y leche; además hacer mención que los productos derivados de la leche como el queso fresco, constituye una fuente de ingresos económico constante para estos criadores (García, 2006).

### **2.13.1 Características productivas y reproductivas de los búfalos de agua**

El búfalo de agua es el principal animal productor de leche para algunos países. Más del cinco por ciento de la leche en el mundo es producido por el búfalo. Entre las principales razas lecheras tenemos a Murrah y Jafarabadi. En cuanto a las características de la leche de búfalo, ésta tiene más sólidos totales que la leche de vaca, ya que contiene menos agua, más grasa, ligeramente más lactosa, y más proteína. El contenido de grasa de la leche de búfalo es de 6-8 por ciento, pero puede ser más si los animales son bien alimentados. Aunque no es concluyente,



el valor biológico de la proteína de la leche del búfalo es más alto que de la leche de vaca. El contenido de minerales es similar, con excepción del fósforo que es casi el doble en la leche de búfalo, el nivel de cloruro de sodio es más bajo; además carece de caroteno precursora de la vitamina A, sin embargo el contenido de ésta vitamina en la leche de la búfala es casi tan alto como de la leche de vaca. El contenido de vitaminas del complejo B y vitamina C es similar en ambas leches, sin embargo la leche de búfalo tiende a tener menos riboflavina (Isuiza *et al.*, 1996).

La riqueza de la leche de búfalo lo hace altamente adecuada para la fabricación de mantequilla clarificada o ghee, mantequilla, quesos blandos y duros, leche condensada y evaporada, crema helada, yogurt, y leche cremosa. Sin embargo, la leche de búfalo es menos adecuada para la elaboración de ciertos tipos de queso duro, debido a que durante el proceso la producción de ácido es más lento que en la leche de vaca, con lo que retienen más agua en la cuajada y se pierde más grasa en el suero. La leche de búfalo, los quesos, y otros productos de su leche son considerados alimentos extraordinarios en todas las localidades donde ellos se producen.

El manejo que se le da a los animales está basado en el sistema de crianza extensivo tradicional de la selva peruana, con algunas modificaciones como: prácticas de destete, control sanitario continuo, y ordeño todos los días. Las hembras se ordeñan una vez al día por las mañanas dejando uno o dos cuartos mamarios para el ternero. Los terneros se destetan a los 6 a 8 meses de edad. Las pariciones ocurren en todos los meses del año, excepto entre agosto – octubre, por lo que se deduce una estacionalidad reproductiva. El promedio de edad al primer parto es de 1,157 días, con un peso mínimo de la hembra de 400 kilos. El intervalo entre partos sobrepasa los 500 días oscilando entre 350 y 612 días, teniendo una fuerte relación con la edad de las búfalas, el sistema de crianza y la alimentación. El intervalo parto-celo es de 160 días, y se ve influenciado por la edad de las hembras, siendo más alto en hembras de edad avanzada. Por otro lado, la producción de leche es baja, variando entre 313 a 533kg considerando que en países como la India la producción alcanza los 800kg. (Isuiza *et al.*, 1996).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de estudio y Ubicación Geográfica**

El distrito Jenaro Herrera está ubicado en el noreste de la selva peruana, en el departamento de Loreto, provincia de Requena, en la margen derecha del bajo Ucayali a 200 km al sur de la ciudad de Iquitos, localizado a 04° 55' de latitud sur y 73° 40' de longitud oeste; a 125 msnm. Está situado en la zona de vida bosque húmedo tropical, con precipitación promedio anual de 2,759 mm, una temperatura media de 26.8°C con una máxima de 32.6°C y una mínima de 21.1°C, la humedad relativa promedio anual es de 87%; el tipo de suelo pertenece al orden de ultisoles, el cual presentan textura franco arenosa a franco arcillosa arenosa extremadamente ácido, y el nivel de materia orgánica es medio, con valores de fósforo y potasio bajos (Isuiza *et al.*, 1996).

#### **3.2 Animales**

La actividad ganadera del distrito de Jenaro Herrera está dedicada netamente a la producción lechera en base a la crianza del búfalo de agua y donde los criadores mantienen a las hembras hasta por 12 años, vendiendo a los machos, tanto crías como adultos, con el propósito de comercializar su carne. Fueron tomadas muestras de sangre a búfalos hembra en edad productiva, mayores a dos años hasta los 12 años de edad, provenientes de cuatro centros de crianza del distrito de Jenaro Herrera y de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Distribución de búfalos hembra muestreados en los Centros de Crianza de Búfalos del Distrito Jenaro Herrera, Departamento de Loreto – Perú. 2008.

Centro de Crianza	Nº de animales	Hembras en edad Productiva	Muestras
Centro de Crianza 1	150	78	28
Centro de Crianza 2	55	31	14
Centro de Crianza 3	67	39	14
Centro de Crianza 4	48	33	14
UNAP	16	13	13
Total	336	194	83

### 3.3 Materiales

Materiales de apoyo:

- Materiales de vidrio y plástico requeridos para la toma de sangre, almacenamiento y procesamiento de los sueros.
- Kit *Neospora caninum* Iscom ELISA
- Láminas antigenadas con taquizoitos de *Neospora caninum* para la prueba de inmunofluorescencia indirecta

Equipo:

- Centrífuga, refrigeradora, incubadora, equipo lector de ELISA, lente filtro de 450nm, microscopio de fluorescencia

Recursos Humanos:

- Personal encargado en la administración de los búfalos de agua en Jenaro Herrera - Iquitos.
- Personal docente con experiencia en el manejo de la técnica de ELISA e inmunofluorescencia.

### 3.4 Tamaño Muestral

Según la fórmula para calcular el tamaño muestral para una proporción, de una población conocida (Thrusfield, 1990), se obtuvo una muestra de 79 animales:

$$n = \frac{NZ^2pq}{d^2(N-1) + Z^2pq}$$

donde:

n= Tamaño muestral

N= Población conocida (402 animales)

Z= Nivel de confianza (95%)

p= Prevalencia a utilizar (14.6%)

q= 1-p

d= Error esperado (7%)

### 3.5 Recolección de muestras

Fueron colectados entre 5 y 7 ml de sangre entera de la vena yugular, utilizando tubos vacutainer sin anticoagulante, rotulando cada muestra considerando la identificación y la edad del animal. Los sueros, almacenados en viales, fueron conservados a 4°C en una refrigeradora de la zona, hasta su transporte al IVITA-Iquitos, para luego ser transportados en congelación hacia el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su procesamiento.

### 3.6 Procesamiento de las muestras

Se empleó la técnica de ELISA indirecto mediante un kit comercial de *Neospora caninum* Iscom ELISA, (SVANOVA BIOTECH AB), utilizando dos diluciones (1:25; 1:100) en sueros; además, se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) a una dilución de 1:100 para confirmar el diagnóstico, tomando las muestras con valores porcentuales positivos (PP) más altos obtenidos en la prueba anterior.

### 3.7 Desarrollo de las técnicas

Antes de emplear las técnicas de ELISA e IFI, se comprobó que el conjugado (anti-IgG bovino) reacciona con la inmunoglobulina G (IgG) de los búfalos de agua, de esta forma se tuvo certeza con los resultados obtenidos.

### 3.7.1 Comprobación del conjugado anti IgG bovino

- Fueron utilizados tres sueros bovino con presencia de anticuerpos contra enfermedades conocidas como controles positivos, y solución buffer como control negativo. Se empleó tres sueros de búfalos.
- Se diluyeron los sueros bovinos y de los búfalos a proporción uno en dos con solución buffer a pH 9.
- Se agregó 50µL de los sueros bovinos y de los búfalos, diluidos y sin diluir, además de la solución buffer, a 14 pocillos de una placa, con el propósito de fijar los anticuerpos presentes en los sueros.
- Se incubó a 4°C por 24 horas.
- Luego se lavó cada pocillo cuatro veces con 300µL de solución PBS.
- Después se agregó 50µL de conjugado a cada pocillo, y se dejó incubar por una hora a 37°C.
- Se lavó tres veces cada pocillo con 300µL de solución PBS.
- Luego se añadió 50µL de sustrato a los pocillos, cubriendo la placa con papel aluminio.
- Se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente se observa el cambio de coloración a un azul intenso tanto en las muestras como en los controles positivos. El buffer no cambia de color.

**Interpretación:** El cambio de coloración nos indica que el conjugado anti-IgG bovino reacciona con los anticuerpos de los búfalos (IgG) presentes en los sueros, por lo que si se puede emplear en las técnicas antes mencionadas.

### 3.7.2 Técnica de ELISA indirecto

- Diluir la solución PBS-Tween (PBST) a concentración 20X a proporción 1/20 en agua destilada. Se obtiene PBS-Tween Buffer (PBSTB).
- Diluir los controles y sueros problema a proporción 1:25 y 1:100 con PBSTB.
- Agregar 100µL de los controles y las muestras, pre diluidas, a los pocillos de la placa.
- Sellar la placa con parafilm, e incubar a 37°C por una hora.
- Lavar la placa tres veces con 300µL de PBSTB, eliminando todos los restos de líquido.

- Adicionar 100µL de conjugado a cada pocillo, sellar la placa con parafilm e incubar a 37°C por una hora.
- Lavar la placa tres veces con 300µL de PBSTB, eliminando todos los restos de líquido.
- Agregar 100µL de solución sustrato a los pocillos.
- Incubar la placa por 10 minutos a temperatura ambiente, y observar un cambio de coloración (turquesa) en el control positivo.
- Agregar 50µL de solución stop para parar la reacción.
- Medir la densidad óptica (OD) de los controles y las muestras a 450nm en el Lector de ELISA.

**Interpretación:** Se calcula los valores porcentuales positivos (PP)

$$PP = \frac{\text{Valor promedio de OD (muestra o control negativo)}}{\text{Valor promedio de OD (control positivo)}} \times 100$$

Punto de Corte: PP < 20 es negativo; PP ≥ 20 es positivo.

### 3.7.3 Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

- Se trabajó todas las muestras de suero cuyos valores PP hallados con la técnica de ELISA a dilución 1:100, fueron altos.
- Utilizar láminas de inmunofluorescencia de 12 hoyos, cuyo interior contiene taquizoitos fijados de *Neospora caninum*.
- Diluir los sueros y control positivo a proporción 1:100 con solución PBS 1X.
- Agregar 10µL de la dilución a cada hoyo.
- Luego incubar en una cámara húmeda colocada en una estufa a 37°C durante 30 minutos.
- Lavar las láminas en una placa petri conteniendo PBS 1X, durante 10 minutos en un agitador de placas. Este procedimiento se repite dos veces.
- Secar bien la lámina sin tocar los hoyos.
- Adicionar 10µL de conjugado a cada hoyo.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos, en una cámara húmeda colocada en la estufa.
- Después lavar nuevamente como se describe anteriormente, y añadir un lavado con agua destilada por 10 minutos.

- Secar bien las láminas, y agregar 10µL de glicerina a cada hoyo, luego colocar una laminilla cubreobjeto, y mantener en refrigeración hasta su lectura
- Observar la lámina en el microscopio de fluorescencia a objetivo de 100X.

**Interpretación:** Es positivo si se observa fluorescencia en todo el contorno del taquizoito. Por el contrario, es negativo si no hay fluorescencia o esta es parcial.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se sabe que la neosporosis es una enfermedad emergente en diferentes partes del mundo. En la industria ganadera se le considera como uno de los principales problemas reproductivos manifestando cuadros de aborto como principal signo clínico (Schares *et al.*, 1999). La transmisión se da de forma vertical y horizontal, considerando a la transmisión horizontal muy importante en la persistencia de la infección en el hato de los búfalos de agua (Guarino *et al.*, 2000; Campero *et al.*, 2007; Haji *et al.*, 2007). Se conoce que los caninos son los únicos hospederos definitivos, y en esta especie la enfermedad se manifiesta principalmente con problemas neuromusculares (Barber, 1998).

La validación del conjugado anti IgG bovino, se realizó con el propósito de comprobar la interacción de esta anti IgG bovina con las inmunoglobulinas de los búfalos de agua presente en los sueros, observando una reacción positiva manifestada por un cambio de coloración al realizar la técnica.

No se encontró evidencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en los búfalos de agua procedentes del distrito de Jenaro Herrera, empleando la técnica de ELISA indirecto con las dos diluciones (1:25, 1:100) utilizadas (Cuadro 6).



**Cuadro 6.** Determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos de agua del distrito Jenaro Herrera – Loreto mediante la prueba de ELISA. Perú. 2008.

Centro de Crianza	Nº de animales muestreados	Animales positivos	
		Diluciones	
		1:25	1:100
Centro de Crianza 1	28	0	0
Centro de Crianza 2	14	0	0
Centro de Crianza 3	14	0	0
Centro de Crianza 4	14	0	0
UNAP	13	0	0
Total	83	0	0

Fueron evaluados 83 sueros de búfalos de agua hembra mayores de dos años de edad, provenientes de 5 centros de crianza (cuatro centros privados además de los animales pertenecientes a la Facultad de Agronomía de la UNAP) localizados en el distrito de Jenaro Herrera, departamento de Loreto; mediante la técnica de ELISA indirecto, mostrando todos ellos valores menores al punto de corte ( $< 20$ ). Sin embargo, para confirmar los resultados obtenidos con la técnica de ELISA, once muestras de sueros que presentaron los valores más altos de PP (Anexo 1), fueron analizadas mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta a dilución 1:100; sin embargo ninguna de ellas evidenció fluorescencia completa. Este hallazgo indicaría que estos animales no estuvieron expuestos al parásito ya sea por transmisión vertical como horizontal; o que los niveles de anticuerpos contra dicho agente son inferiores a la dilución 1:25, realizada en el presente estudio. Incluso se excluye la posible transmisión venérea experimentalmente comprobada en ganado bovino (Dubey *et al.*, 2007), dado que la reproducción sólo se realiza por monta natural con búfalos machos de la zona.

Si bien es cierto, la seroprevalencia de *Neospora caninum* en búfalos de agua ha sido estudiada en muchos países, en el Perú estos estudios no existen, siendo este el primer estudio serológico sobre *Neospora caninum* en los búfalos de agua de nuestro país. Aunque se sabe que la neosporosis bovina es altamente prevalente en las principales cuencas lecheras observando una presencia de anticuerpos en el 57% de vacas en Arequipa (Andressen, 1999); 42.9% en Cajamarca (Cabrera *et al.*, 2000); y el 29.6% en el Valle de Lima (Silva *et al.*, 2002). Además estudios realizados en bovinos cebuinos y cruzados pertenecientes a la Estación Experimental IVITA–Pucallpa, demostraron que sólo un 1.5% (4/268) de animales presentaron anticuerpos contra dicho parásito (Rivera *et al.*, 2004). Al compararse este último resultado con el

encontrado en el presente estudio, se puede observar que la neosporosis no está muy diseminada en la selva baja de nuestro país.

Dentro de los posibles factores que estarían limitando la difusión de *Neospora caninum* se encontrarían: tipo de ganadería existente, tipo de transmisión, número de caninos domésticos.

En cuanto al tipo de ganadería existente, se sabe que es exclusivamente de ganado bubalino, donde la primera importación de búfalos de agua se dio a finales de los años 70, época en que llegaron a Jenaro Herrera los primeros animales; posteriormente se llevaron a cabo otras importaciones, procedentes del estado Río Grande del Sur-Brasil (Isuiza *et al.*, 1996), donde se reporta una prevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* de 14.6% (24/164), siendo considerada baja (Flôres *et al.*, 2006). Al compararse este resultado con el obtenido en el presente estudio, se observa que el resultado hallado fue menor, por lo que se podría proponer que existe una mayor probabilidad de que los animales introducidos en Jenaro Herrera sean seronegativos, y que los descendientes de estos también podrían serlo; además existe un reporte en China (0/40) similar al encontrado en el presente estudio, donde ningún búfalo de agua presenta evidencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* (Yu *et al.*, 2007).

Aunque la transmisión vertical ocurre en búfalos (Rodrigues *et al.*, 2005) y esta es una ruta de infección frecuente y eficiente en el ganado bovino (Dubey, 2003), no está claro cuál ruta de infección es más importante en los búfalos; aunque algunos autores sugieren que la transmisión horizontal juega un papel importante en la persistencia de la infección en el hato de los búfalos de agua (Guarino *et al.*, 2000; Campero *et al.*, 2007; Haji *et al.*, 2007), sin embargo para que exista esta posibilidad de transmisión es necesario la presencia de hospederos intermediarios positivos; ya sean bovinos, ovinos o caprinos, que sean a su vez presas de perros. Sin embargo ninguno de los hospederos intermediarios antes mencionados están presentes en la zona, por lo que la posibilidad de esta vía sería poco probable.

Por otro lado se conoce que los caninos juegan un papel importante en la diseminación del parásito en el hato, considerando el tipo de transmisión horizontal; sin embargo en Jenaro Herrera el número de caninos domésticos por centro de crianza es de uno o dos animales como máximo, además estos no están en contacto directo con los búfalos de agua, limitando así la posibilidad de infección por esta vía.

Se ha reportado la transmisión venérea sólo experimentalmente en el ganado bovino, observando que las vacas inseminadas con semen contaminado con taquizoitos de *Neospora*

*caninum* no adquirieron la infección (Dubey *et al.*, 2007). De darse este tipo de transmisión en los búfalos de agua, específicamente en Jenaro Herrera, donde se da la monta natural con búfalos machos de la zona, no sería de mucha importancia ya que como se mencionó anteriormente, los animales serían seronegativos.

Otro dato a tener en cuenta es el porcentaje de mortalidad de las crías de búfalos, que es de 1 a 2% (García, 2006), donde los criadores indican que las muertes que ocurren al nacer son generalmente por accidentes, nacidos fuera del horario normal de trabajo y supervisión insuficiente, no siendo causa de aborto aparentemente enfermedades reproductivas.

Por lo antes señalado, los resultados de este estudio sólo indicarían que los búfalos de agua no estuvieron expuestos a *Neospora caninum* en ningún momento de su vida, Además se hace necesario realizar más estudios que determinen la implicancia de *N. caninum* como causante de problemas reproductivos en los búfalos de agua.

## V. CONCLUSIONES

- No se halló (0/83) la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en cinco centros de crianza ubicados en el distrito de Jenaro Herrera.
- El no haber encontrado evidencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en los búfalos de agua del distrito de Jenaro Herrera, no implica que todos los animales sean seronegativos.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar nuevos estudios que determinen las implicancias económicas de *Neospora caninum* como agente causal de problemas productivos y reproductivos en los búfalos de agua del distrito Jenaro Herrera y de la Selva de nuestro país.
- Realizar estudios con técnicas más sensibles como las pruebas moleculares para descartar la presencia de *Neospora caninum* en los búfalos de agua de nuestra amazonía.
- Mantener el estatus seronegativo de los animales muestreados en Jenaro Herrera, dando recomendaciones que indiquen el diagnóstico de nuevos búfalos adquiridos como reproductores.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Almería S, Ferrer D, Pabón M, Castellà J, Mañas S. 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. Vet Parasitol 107: 287-294.

Almeria S, de Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC. 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. Parasite Immunol 25: 383-392.

Alvarez G, Collantes F, Costa E, Rebordosa X, Ortega-Mora L. 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. Vet Res 34: 341-352.

Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Assoc 198: 241-244.

Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. Anim Reprod Sci 60-61: 417-431.

Andressen H. 1999. Neosporosis en el Perú y el mundo. Rev Cienc Vet 15: 11-16.

Antony A, Williamson NB. 2001. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. N Z Vet J 49: 42-47.

Atkinson R, Harper PA, Reichel MP, Ellis JT. 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. Parasitology Today 16: 110-114.

- Baker D, Morishita T, Brooks D, Shen S, Lindsay D, Dubey J. 1995. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. J Parasitol 81: 783-785.
- Barber J. 1998. Canine neosporosis. Waltham Focus 8: 25-29.
- Barr B, Anderson M, Dubey J, Conrad P. 1991. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet Pathol 28: 110-116.
- Barr B, Anderson M, Woods L, Dubey J, Conrad P. 1992. *Neospora*-like protozoan infections associated with abortion in goat. J Vet Diagn Invest 4: 365-367.
- Barr BC, Conrad PC, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG. 1994a. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. Laboratory Investigation 71: 236-242.
- Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, BonDurant RH, Ardans AA, Oliver MN, Conrad PC. 1994b. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. J Vet Diagn Invest 6: 207-215.
- Bartley PM, Wright S, Sales J, Chianini F, Buxton D, Innes EA. 2006. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. Parasitology 133: 421-432.
- Basso W, Venturini M, Bacigalupe D, Kienast M, Unzaga J, Larsen A, Machuca M, Venturini L. 2005. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a Boxer puppy from Argentina. Vet Parasitol 131: 299-303.
- Baszler TV, Knowles DP, Dubey JP, Gay JM, Mathison BA, McElwain TF. 1996. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Microbiology 34: 1423-1428.

- Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA. 1999. Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 29: 1635-1646.
- Bjerkas I, Mohn S, Presthus J. 1984. Unidentified cystforming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 70: 271-274.
- Bjerkas I, Jenkins MC, Dubey JP. 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1: 214-221.
- Björkman C, Lundén A, Holmdahl J, Barber J, Trees AJ, Uggla A. 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol* 16: 643-648.
- Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJ, Uggla A. 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 208: 1441-1444.
- Björkman C, Uggla A. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 29: 1497-1507.
- Björkman C, Naslund K, Stenlund S, Maley S, Buxton D, Uggla A. 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 41-44.
- Björkman C, Gondim L, Naslund K, Trees A, McAllister M. 2005. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. *Veterinary Parasitology* 128: 195-200.
- Buxton D, McAllister M, Dubey J. 2002. The comparative patogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology* 18: 546-553.
- Cabrera M, Ortiz P, Claxton J, Williams D, Trees A. 2000. Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en ganado vacuno en Perú. En: IV Congreso Peruano de Parasitología. 212 p.



- Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. 1998. *Neospora caninum* associated abortion in dairy herd in Argentina. Veterinary Record 143: 228-229.
- Campero CM, Pérez A, Moore DP, Crudeli G, Benitez D, Draghi MG, Cano D, Konrad JL, Odeón AC. 2007. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on four ranches in Corrientes province, Argentina. Vet Parasitol 150: 155-158.
- Cantile C, Arispici M. 2002. Necrotizing cerebellitis due to *Neospora caninum* infection in an old dog. Journal of Veterinary Medicine 49: 47-50.
- Cheadle M, Spencer M, Blagburn B. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in non-domestic felids from Southern Africa. J Zoo Wildlife Med 30: 248-251.
- Clark DA, Arck PC, Chaouat G. 1999. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. Am J Reprod Immunol 41: 5-22.
- Conrad P, Barr B, Sverlow K, Anderson M, Daft B, Kinde H, Dubey J, Munson L, Ardans A. 1993. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. Parasitology 106(3): 239-249.
- Davison HC, Otter A, Trees AJ. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. Int J Parasitol 29: 1683-1689.
- Davison HC, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Williams DJ, Kelly DF, Trees AJ. 2001. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. Res Vet Sci 70: 163-168.
- De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. Int J Parasitol 29: 1647-1657.

- Del Campo J, Chávez A, Delgado A, Falcón N, Ornelas A, Casas E, Serrano E. 2003. Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. Rev Inv Vet Perú 14: 145-149.
- Dijkstra T, Barkema H, Eysker M, Hesselink J, Wouda W. 2002. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. Vet Parasitol 105: 99-104.
- Dubey J, Hattel A, Lindsay D, Topper M. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. J Am Vet Med Assoc 193: 1259-1263.
- Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS, Topper MJ. 1990. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. J Parasitol 76: 127-130.
- Dubey J, Lindsay D. 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. J Vet Diagn Invest 2: 230-233.
- Dubey J, Lindsay D. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Veterinary Parasitology 67: 1-59.
- Dubey J, Morales J, Villalobos P, Lindsay D, Blagburn B, Topper M. 1996. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. J Am Vet Med Assoc 208: 263-265.
- Dubey JP. 1999. Recent advances in *Neospora* and Neosporosis. Vet Parasitol 84: 349-367.
- Dubey JP, Barr BC, Barta JR, *et al.* 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. Int J Parasitol 32: 929-946.
- Dubey JP. 2003a. Neosporosis in cattle. J Parasitol 89: 42-56.
- Dubey J. 2003b. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. The Korean Journal of Parasitology 41: 1-16.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Pathol 134: 267-289.

- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 20: 323-367.
- Ellis J, Luton K, Baverstock PR, Brindley PJ, Nimmo KA, Johnson AM. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum*. Mol Biochem Parasitol 64: 303-311.
- Eperon S, Bronnimann K, Hemphill A, Gottstein B. 1999. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (MT) mice to *Neospora caninum* infection. Parasite Immunol 21: 225-236.
- Flôres F, Arenhart S, Viçosa F. 2006. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. Ciência Rural 36(6): 1948-1951.
- Fuchs N, Sonda S, Gottstein B, Hemphill A. 1998. Differential expression of cell surface-and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. J Parasitol 84: 753-758.
- Fujii TU, Kasai N, Nishi SM, Dubey JP, Gennari SM. 2001. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. Vet Parasitol 99: 331-334.
- Furuta PI, Mineo TWP, Carrasco AOT, Godoy GS, Pinto AA, Machado RZ. 2007. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. Parasitology 134: 1931-1939.
- García E. 2006. Diagnóstico del recurso ganadero en productores de la localidad de Jenaro herrera, Distrito de Jenaro Herrera, Provincia de Requena, Departamento de Loreto, Río Ucayali, margen derecha. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Iquitos. Univ. Nac. de la Amazonía Peruana. 61p.
- Gennari SM, Rodrigues AAR, Viana RB, Cardoso EC. 2005. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. Vet Parasitol 134: 169-171.
- Georgieva DA, Prelezov PN, Koinarsky V. 2006. *Neospora caninum* and neosporosis-a review. Bulg J Vet Med 9: 1-26.

- Gondim L, Gao L, McAllister M. 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. J Parasitol 88: 1159-1163.
- Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 34: 159–161.
- Gondim LFP, Pinheiro AM, Almeida MAO. 2007. Frequencia de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado da Bahia. Rev Bras Saúde Prod An 8(2): 92-96.
- González L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz G, Maley S, Marco J, Cuervo L. 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Northern Spain. Vet Rec 144: 145-150.
- Guarino A, Fusco G, Savini G, Di Francesco G, Cringoli G. 2000. Neosporosis en water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. Vet Parasitol 91: 15-21.
- Guo ZG, Johnson AM. 1995. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. Parasitol Res 81: 365-370.
- Guy CS, Williams DJL, McGarry JW, Guy F, Trees AJ, Kelly DF, Smith RF, Björkman C. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. Vet. Rec. 149: 443-449.
- Haji MR, Goraninejad S, Hamidinejat H, Ghorbanpour M, Paryab R. 2007. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the south-western region of Iran. Bull Vet Inst Pulawy 51: 233-235.
- Hemphill A, Gottstein B, Kaufmann H. 1996. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. Parasitology 112(2): 183-197.
- Hemphill A, Gottstein B. 1996. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. Parasitology Research 82(6): 497-504.

- Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Hehl A. 1999a. The antigenic composition of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 29: 1175-1188.
- Hemphill A. 1999b. The host-parasite relationship in neosporosis. Adv Parasitol 43: 47-104.
- Hemphill A, Gottstein B, Conraths FJ, Meerschman F, Ellis JT, Innes EA, McAllister MM, Ortega-Mora LM, Tenter AM, Trees AJ, Uggla A, Williams DJL, Wouda W. 2000. A European perspective on *Neospora caninum*. Inter J Parasitol 30: 877-924.
- Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A. 2006. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. Parasitology 133: 261-278.
- Hilali M, Romand S, Thulliez P, Kwok O, Dubey J. 1998. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. Vet Parasitol 75: 269-271.
- Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. 1995. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. J Am Med Assoc 273: 1933-1936.
- Holmdahl OJ, Mattsson JG, Uggla A, Johansson KE. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. FEMS Microbiol Lett 119: 187-192.
- Huong LTT, Ljungstrom BL, Uggla A, Bjorkman C. 1998. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. Vet Parasitol 75: 53-57.
- Innes E, Panton W, Marks J, Trees A, Holmdahl J, Buxton D. 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of <sup>3</sup>H uracil. J Comp Pathol 113: 95-100.
- Innes E, Andrianarivo A, Bjorkman C, Williams D, Conrad P. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends Parasitol 18: 497-504.
- Izuiza M, Pezo R, López J. 1996. Estudio sobre el búfalo de agua en Jenaro Herrera. Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana. Documento Técnico N° 23. 69p.

Jenkins MC. 2001. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet Parasitol* 101: 291-310.

Kasper LH, Khan IA. 1998. Antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect Immun* 66: 1554-1560.

Keller N, Naguleswaran A, Cannas A, Vonlaufen N, Bienz M, Björkman C, Bohne W, Hemphill A. 2002. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infection and Immunity* 70: 3187-3198.

Khan IA, Schwartzman JD, Fonseka S, Kasper LH. 1997. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp Parasitol* 85: 24-34.

Kobayashi Y, Yamada M, Omata Y, Koyama T, Saito A, Matsuda T, Okuyama K, Fujimoto S, Fukuoka H, Matsui T. 2001. Naturally-Occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *The Journal of Parasitology* 87: 434-435.

Lindsay DS, Rippey NS, Cole RA, Parsons LC, Dubey JP, Tidwell RR, Blagburn BL. 1994. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. *Am J Vet Res* 55: 976-981.

Lindsay D, Steinberg H, Dubielzig R, Semrad S, Konkole D, Miller P, Blagburn B. 1996. Central nervous system neosporosis in a foal. *J Vet Diagn Invest* 8: 507-510.

Lindsay D, Upton S, Dubey J. 1999. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol* 29: 1521-1523.

Lindsay D, Ritter D, Brake D. 2001. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *J Parasitol* 87: 909-911.

Lovett JL, Howe DK, Sibley LD. 2000. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 107: 33-43.

McAllister M, Dubey J, Lindsay D, Jolley W, Wills R, McGuire. 1998. Dogs are definitive hosts *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28: 1473-1478.

- McAllister MM, Björkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. J Am Vet Med Assoc 217: 881-887.
- McAllister M. 2005. The comparative pathology of neosporosis. En: I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*. Sao Paulo. 14-16p.
- Meenakshi K, Sandhu S, Ball M, Kumar H, Sharma S, Sidhu P, Sreekumar C, Dubey J. 2007. Seroprevalence of *neospora caninum* antibodies in cattle and water buffaloes in India. J Parasitol 93(6): 1374-1377.
- Moore DP, Odeón AC, Campero CM. 2001. Neosporosis bovina: Una Actualización. Vet Arg Vol XVIII 180: 752-775.
- Moore DP, Leunda MR, Zamorano PI, Odeón AC, Romera SA, Cano A, De Yaniz G, Venturini MC, Campero CM. 2005a. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. Vet Parasitol 130: 29-39.
- Moore DP, Odeón AC, Venturini MC, Campero CM. 2005b. Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Rev Arg Mic 37: 217-228.
- Moskwa B, Cabaj W, Pastusiak K, Bien J. 2003. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. Acta Parasitol 48: 138-141.
- Moskwa B, Pastusiak K, Bien J, Cabaj W. 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. Parasitol Res 100: 633-636.
- Naguleswaran A, Cannas A, Keller N, Vonlaufen N, Björkman C, Hemphill A. 2002. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC3 mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology 32(6): 695-704.

- Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, Stowell KM, Gillespie L. 2004. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. *Veterinary Parasitology*, 122, 307–315.
- Ordeix L, Lloret A, Fondevila D, Dubey JP, Ferrer L, Fondati A. 2002. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 38: 415-419.
- Ortega-Mora L, Collantes E, Álvarez G. 2001. La Neosporosis del ganado bovino: Una enfermedad emergente. *Rev Cien Vet* 17: 7-14.
- Ortega-Mora L, Fernández-García A, Gómez-Bautista M. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitológica* 51: 1-14.
- Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, Marsh AE, Cray C, Barr BC. 1998. A Modified Agglutination Test for *Neospora caninum*: Development, Optimizacion, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 467 - 473.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 83: 82-87.
- Pérez-Zaballos FJ, Ortega-Mora LM, Ivarez-García GA, Collantes-Fernández E, Navarro Lozano V, García-Villada L, Costas E. 2005. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *J Parasitol* 91: 507-510.
- Perlé KMD, Del Piero F, Carr RF, Harris C, Stromberg PC. 2001. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. *J Vet Diagn Invest* 13: 252-255.
- Peters M, Lutkefels E, Heckeroth A, Schares G. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol* 31: 1144-1148.
- Puray N. 2005. Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 48 p.



- Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. 2002. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy?. Trends Parasitology 18: 391-394.
- Raghupathy R. 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. Immunol Today 18: 478-482.
- Rivera H, Benito A, Ramos O, Manchego A. 2004. Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la Estación Experimental de Trópico del Centro de Investigaciones IVITA. Rev Inv Vet Perú 15(2):120-126.
- Roberts CW, Walker W, Alexander W. 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. Clin Microbiol Rev 14: 476-488.
- Rodríguez G. 2009. Neosporosis en la ganadería pecuaria en el Perú. Tesina de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 48 p.
- Rojas M. 2004. Neosporosis de los rumiantes domésticos peruanos. 2º ed. 146p.
- Romand S, Thulliez P, Dubey JP. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. Parasitol Res 84: 50-53.
- Sager H, Gloor M, Björkman C, Kritzner S, Gottstein B. 2003. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. Vet Parasitol 112: 1-10.
- Schares G, Conraths FJ, Reichel MP. 1999. Bovine neosporosis: Comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. International Journal for Parasitology 29: 1659-1667.
- Schares G, Pantchev N, Barutzki D, Heydorn AO, Bauer C, Conraths FJ. 2005. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. Int J Parasitol 35: 1525-1537.
- Serrano E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mateos-Sanz A, Martínez A, Atxaerandio R, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM. 2006. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. Vet Parasitol 135: 197-203.

- Serrano E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mota RA, Martínez A, Del Pozo I, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM. 2007. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology* 67: 729-737.
- Silva P, Chávez A, Rivera H, Casas E. 2002. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del Valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 13(2): 51-55.
- Sonda S, Fuchs N, Gottstein B, Hemphill A. 2000. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 108: 39-51.
- Speer CA, Dubey JP. 1989. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J Protozool* 36: 458-463.
- Tanaka T, Hamada T, Inoue N, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T. 2000. The role of CD4+ or CD8+ T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 90: 183-191.
- Tarantino C, Rossi G, Kramer LH, Perrucci S, Cringoli G, Macchioni G. 2001. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. *Vet Parasitol* 102: 77-83.
- Thellin O, Heinen E. 2003. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology* 185: 179-184.
- Thilsted J, Dubey J. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1: 205-209.
- Thrusfield M. 1990. *Epidemiología Veterinaria*. 1º ed. Zaragoza. Ed. Acribia. p 228-230.
- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. 1997. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Investig* 9: 44-49.
- Tizard J. 1992. *Inmunología Veterinaria*. Cuarta Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. México. p. 280-294.

- Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams DJL. 2002. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet Parasitol* 109: 147-154.
- Uggla A, Stenlund S, Holmdahl OJM, Jakubek EB, Thebo P, Kindahl H, Björkman C. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int J Parasitol* 28: 1467-1472.
- Wapenaar W, Jenkins MC, O'Handley RM, Barkema HW. 2006. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*) based on microscopic examination, PCR and DNA-sequencing. *J. Parasitol* 92: 1270-1274.
- Williams DJL, McGarry J, Guy F, Barber J, Trees AJ. 1997. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *The Veterinary Record* 140: 328-331.
- Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, Maceachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitol* 121: 347-358.
- Williams DJL, Guy CS, Smith RF, Guy F, McGarry JW, McKay JS, Trees AJ. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Inter J Parasitol* 33: 1059-1065.
- Wouda W, Moen AR, Schukken YH. 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *N. caninum* epidemic. *Theriogenology* 49: 1311-16.
- Yamane I, Kitani H, Kokuho T, Shibahara T, Haritani M, Hamaoka T, Shimizu S, Koiwai M, Shimura K, Yokomizo Y. 2000. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *J Vet Med Sci* 62: 347-351.
- Yu J, Xia Z, Liu Q, Liu J, Ding J, Zhang W. 2007. Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. *Vet Parasitol* 143: 79-85.

## VIII. ANEXO 1

Valores de Densidad Óptica y Valores Porcentuales Positivos de la prueba de ELISA a dilución 1:100

Muestra	Valor OD	Valor PP	Muestra	Valor OD	Valor PP
1 J	0,059	3,02	43 J	0,071	3,64
2 J	0,06	3,07	44 J	0,099	5,07
3 J	0,073	3,74	45 J	0,084	4,30
4 J	0,057	2,92	46 J	0,086	4,41
<b>5 J</b>	<b>0,131</b>	<b>6,71</b>	<b>47 J</b>	<b>0,115</b>	<b>5,89</b>
6 J	0,08	4,10	<b>48 J</b>	<b>0,158</b>	<b>8,09</b>
7 J	0,076	3,89	49 J	0,076	3,89
8 J	0,061	3,13	50 J	0,079	4,05
9 J	0,064	3,28	<b>51 J</b>	<b>0,168</b>	<b>8,61</b>
10 J	0,068	3,48	<b>52 J</b>	<b>0,167</b>	<b>8,56</b>
11 J	0,074	3,79	53 J	0,058	2,97
<b>12 J</b>	<b>0,115</b>	<b>5,89</b>	54 J	0,065	3,33
<b>13 J</b>	<b>0,1</b>	<b>5,12</b>	55 J	0,089	4,56
14 J	0,082	4,20	56 J	0,096	4,92
15 J	0,081	4,15	57 J	0,085	4,35
<b>16 J</b>	<b>0,127</b>	<b>6,51</b>	58 J	0,08	4,10
17 J	0,068	3,48	59 J	0,085	4,35
18 J	0,062	3,18	60 J	0,079	4,05
19 J	0,072	3,69	61 J	0,057	2,92
20 J	0,072	3,69	62 J	0,079	4,05
21 J	0,088	4,51	63 J	0,075	3,84
22 J	0,097	4,97	64 J	0,056	2,87
<b>23 J</b>	<b>0,13</b>	<b>6,66</b>	65 J	0,055	2,82
24 J	0,075	3,84	66 J	0,049	2,51
25 J	0,078	4,00	67 J	0,053	2,72
26 J	0,061	3,13	68 J	0,07	3,59
27 J	0,081	4,15	69 J	0,052	2,66
28 J	0,075	3,84	70 J	0,061	3,13
29 J	0,084	4,30	1	0,072	3,69
30 J	0,08	4,10	2	0,054	2,77
31 J	0,095	4,87	4	0,053	2,72
<b>32 J</b>	<b>0,102</b>	<b>5,23</b>	5	0,05	2,56
33 J	0,072	3,69	6	0,058	2,97
34 J	0,065	3,33	8	0,089	4,56
35 J	0,068	3,48	9	0,048	2,46
36 J	0,074	3,79	11	0,056	2,87
37 J	0,066	3,38	12	0,069	3,53
38 J	0,071	3,64	13	0,052	2,66
39 J	0,09	4,61	14	0,058	2,97
40 J	0,071	3,64	15	0,055	2,82
<b>41 J</b>	<b>0,101</b>	<b>5,17</b>	16	0,053	2,72
42 J	0,096	4,92			